

Aus dem Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie  
der Freien Universität Berlin

Leiter: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

---

VERSUCHE ZUR SPALTUNG VON DIMEREM THYMIN IN  
MONOMERES DURCH IONISIERENDE STRAHLUNG

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde  
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zahnarzt Wolf-Diederich Lienau  
aus Lübeck

1972



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

Aus dem Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie  
der Freien Universität Berlin

Leiter: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

---

VERSUCHE ZUR SPALTUNG VON DIMEREM THYMIN IN  
MONOMERES DURCH IONISIERENDE STRAHLUNG

Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde  
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zahnerzt Wolf-Diederich Lienau  
aus Lübeck

Referent: Prof. Dr. Dieter Hartmann .....

Korreferent: Prof. Dr. E.-R. Lochmann .....

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Zahn-, Mund-  
und Kieferheilkunde der Freien Universität Berlin



Promoviert am: 27. September 1972 .....

## Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                        | Seite |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Abkürzungen                                                                                            | 7     |
| 1 EINLEITUNG                                                                                           | 8     |
| 1.1 Aufbau der DNS                                                                                     | 8     |
| 1.2 Struktur und Eigenschaften von monomerem und dimerem Thymin                                        | 9     |
| 1.3 Allgemeine Strahlenwirkung                                                                         | 12    |
| 1.3.1 Direkter und indirekter Strahleneffekt                                                           | 13    |
| 1.3.2 Radiolyse des Wassers und die Primärreaktionen der Bestrahlungsprodukte                          | 13    |
| 1.3.3 Der Sauerstoffeffekt                                                                             | 15    |
| 1.4 Wirkung der UV-Strahlung auf Nucleinsäuren, insbesondere auf Thymin                                | 17    |
| 1.5 Die Wirkung ionisierender Strahlung auf DNS und dimeres Thymin — bisherige Arbeiten und Ergebnisse | 18    |
| 1.6 Biologische Bedeutung der Dimerisation in Nucleinsäuren durch die Einwirkung von UV-Strahlen       | 22    |
| 1.7 Biologische Wirkung unterschiedlicher Arten ionisierender Strahlung                                | 23    |
| 2 ZIEL DER EIGENEN UNTERSUCHUNGEN                                                                      | 25    |
| 3 MATERIAL UND METHODEN                                                                                | 26    |
| 3.1 Herstellung von dimerem Thymin                                                                     | 26    |
| 3.1.1 UV-Bestrahlung                                                                                   | 27    |

|                                                                                                                                                                          | Seite |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3.2 Röntgenbestrahlung                                                                                                                                                   | 28    |
| 3.3 Elektronenbestrahlung                                                                                                                                                | 29    |
| 3.4 UV-Dosimetrie                                                                                                                                                        | 31    |
| 3.5 Röntgen-Dosimetrie                                                                                                                                                   | 31    |
| 3.6 34 MeV-Elektronen-Dosimetrie                                                                                                                                         | 32    |
| 3.7 Spektralphotometrische Extinktionsmessung                                                                                                                            | 33    |
| 3.8 pH-Messung                                                                                                                                                           | 33    |
| 3.9 Bestimmung des Schmelzpunktes von TT                                                                                                                                 | 33    |
| 4 EIGENE VERSUCHSERGEBNISSE                                                                                                                                              | 34    |
| 4.1 Spektralphotometrische Bestimmung der Extinktion von monomerem Thymin in Abhängigkeit von der Wellenlänge                                                            | 34    |
| 4.1.2 Spektralphotometrische Bestimmung der Extinktion von dimerem Thymin in Abhängigkeit von der Wellenlänge                                                            | 34    |
| 4.1.3 Spektralphotometrische Bestimmung der Extinktion von dimerem Thymin in Abhängigkeit von der Wellenlänge in Gegenwart unterschiedlicher Mengen von monomerem Thymin | 37    |
| 4.2 Spektralphotometrische Ermittlung der Eichkurven für wässrige Lösungsgemische von monomerem und dimerem Thymin                                                       | 39    |
| 4.3 Untersuchung verschiedener Faktoren auf ihre Wirkung bei der Spaltung von dimerem Thymin in monomeres durch Röntgenstrahlen                                          | 40    |
| 4.3.1 Spaltung von dimerem Thymin in monomeres durch Röntgenstrahlen in Abhängigkeit von der Dosis und der TT-Konzentration                                              | 40    |

|                                                                                                                                                                   | Seite |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 4.3.2 Spaltung von dimerem Thymin in monomeres<br>durch Röntgenstrahlen in Abhängigkeit von<br>Dosis und Temperatur                                               | 44    |
| 4.3.3 Spaltung von dimerem Thymin in monomeres<br>durch Röntgenstrahlen in Abhängigkeit von<br>der Dosisleistung                                                  | 44    |
| 4.3.4 Beeinflussung der Spaltung von dimerem Thymin<br>in monomeres bei Röntgenbestrahlung, durch<br>Zugabe von Cystein                                           | 47    |
| 4.4 Spaltung von dimerem Thymin in monomeres<br>durch schnelle Elektronen und Röntgenstrahlen<br>unterschiedlicher Energie                                        | 49    |
| 4.4.1 Spaltung von dimerem Thymin in monomeres<br>durch schnelle Elektronen und Röntgenstrahlen<br>gleicher Dosisleistung                                         | 51    |
| 4.5 Ermittlung der Streubreiten bei der Spaltung<br>von TT in T durch konstante Dosen unterschied-<br>licher Strahlenqualitäten an Hand von 30<br>Einzelmessungen | 53    |
| 4.5.1 Statistische Prüfung der TT-Spaltung in<br>monomeres Thymin durch unterschiedliche<br>Strahlenenergie                                                       | 54    |
| 5 DISKUSSION DER EIGENEN VERSUCHSERGEBNISSE                                                                                                                       | 56    |
| 5.1 Diskussion der Methodik                                                                                                                                       | 57    |
| 5.1.1 Spektralphotometrische Auswertung                                                                                                                           | 57    |
| 5.1.2 Mögliche Meßungenauigkeiten durch<br>Verunreinigungen                                                                                                       | 58    |
| 5.1.3 Dosimetrie und verwendete G-Werte als mögliche<br>Ursache für die unterschiedliche Strahlen-<br>wirkung                                                     | 60    |

|                                                                                                                                                                                       | Seite |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 5.2 Ursachen, die bei gleichen Versuchsbedingungen für die unterschiedliche Wirkung von Röntgenstrahlen und schnellen Elektronen auf die Spaltung von TT in monomeres in Frage kommen | 63    |
| 5.2.1 Unterschiedliche Energie der ionisierenden Strahlen als Ursache für die unterschiedliche Spaltung von TT in monomeres                                                           | 63    |
| 5.2.2 Unterschiedliche Dosisleistung der ionisierenden Strahlen als Ursache für die unterschiedliche Spaltung von TT in monomeres                                                     | 66    |
| 5.3 Die Spaltung von TT in monomeres in Abhängigkeit von der Konzentration                                                                                                            | 69    |
| 5.4 Die Abhängigkeit der TT-Spaltung in monomeres von der Temperatur                                                                                                                  | 70    |
| 5.5 Die Schutzwirkung von Cystein auf die Spaltung von TT in monomeres durch ionisierende Strahlen                                                                                    | 72    |
| 5.6 Die Spaltung von TT in monomeres und die relative biologische Wirksamkeit von Röntgenstrahlen und schnellen Elektronen                                                            | 73    |
| 6 ZUSAMMENFASSUNG                                                                                                                                                                     | 76    |
| 7 LITERATURVERZEICHNIS                                                                                                                                                                | 78    |

# Abkürzungen

T = monomeres Thymin  
TT = dimeres Thymin  
UU = dimeres Uracil  
DNS = Desoxyribonucleinsäure  
REW = Relative Biologische Wirksamkeit  
LET = linear energy transfer

## 1. Einleitung

### 1.1 Aufbau der DNS

Die DNS ist ein hochmolekulares Polynukleotid. In langer Kette sind Nucleoside durch Phosphorsäure in Diesterbindung miteinander verknüpft. Die Nucleoside enthalten den Zucker Desoxyribose, sowie die Purinbasen Adenin und Guanin und die Pyrimidinbasen Thymin und Cytosin.

Die Sekundärstruktur der DNS kann 1953 durch das von Watson und Crick (1) aufgestellte Modell geklärt werden. Danach sind zwei Polynucleotidstränge, deren Basen über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind, in Form eines Doppelstranges zu einer Schraube verdrillt.

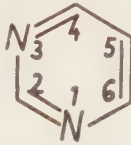
Aus sterischen Gründen können jeweils nur die Basen Adenin und Thymin, bzw. Cytosin und Guanin durch Wasserstoffbindungen miteinander in Beziehung treten. Dadurch legt ein Strang die Basensequenz des anderen fest.

Die Sequenz der Basen im Polynucleotidstrang stellt die genetische Information dar. Für die Weitergabe dieser Information in Form der identischen Reduplikation trennt sich die Doppelhelix durch Lösung der Wasserstoffbrücken in zwei Einzelstränge auf. An die in der genetisch determinierten Sequenz vorliegenden Basen legen sich die komplementären Basen an und bilden gemeinsam mit den dazugehörigen Zuckern und Phosphorsäuren einen neuen DNS-Strang.

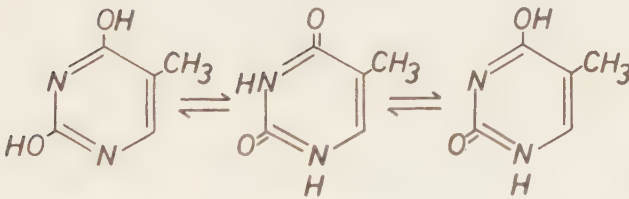
Jede Veränderung der Basenstellung oder der Molekülstruktur der Basen führt bei der Reduplikation zu einer Veränderung der genetischen Information. Diese Veränderungen können spontan auftreten, oder durch exogene Faktoren hervorgerufen werden, wie z.B. durch Pharmaka, UV-Licht oder ionisierende Strahlen.

## 1.2 Struktur und Eigenschaften von monomerem und dimerem Thymin

Thymin gehört zu den Pyrimidinbasen. Der Pyrimidinring, ein Sechsring mit zwei Stickstoffatomen, trägt in 2- und in 6-Stellung je eine Sauerstofffunktion, die eine Tautomerie ermöglichen. Das H-Atom kann am Sauerstoff oder am Ringstickstoff sitzen.



Pyrimidinring



Enolform

Lactonform

Abb. 1: Tautomere Formen vom Thymin

1958 finden Beukers, Ylstra und Terends (3) bei der UV-Bestrahlung von Pyrimidinen und Purinen in gefrorener wässriger Lösung unter anderem ein Bestrahlungsprodukt des Thymins, das nicht mehr die für Thymin charakteristische UV-Absorption mit einem Maximum bei 265 nm zeigt.

Das Bestrahlungsprodukt ist relativ stabil gegen Hitze, Säure und Alkali und wird in aufgetauter Lösung durch UV-Licht wieder in Thymin umgewandelt.

1960 gelingt Beukers und Berends (4) eine erste Struktur-  
aufklärung des Bestrahlungsproduktes. Mit Hilfe von  
Elementaranalyse, Molekulargewichtsbestimmung, Kristall-  
lographie, massenspektrographischer und Infrarotspektro-  
graphischer Untersuchungen stellen sie fest, daß es sich  
um dimeres Thymin (TT) handelt. Zwei Thyminmoleküle der  
Lactamform verbinden sich unter Aufhebung der 5,6-Doppel-  
bindungen zum Dimeren unter Bildung eines Cyclobutanringes.  
Die fehlende 5,6-Doppelbindung des Thymins bewirkt eine  
starke Abnahme der Lichtabsorption bei 264 nm.

Wacker et al. (6,7) und Wang (5) bestätigen die Dimerisa-  
tion von Pyrimidinen in vitro und weisen eine Dimerisation  
auch in vivo, d.h. in der Bakterien-DNS nach (6,7).  
Die Bestrahlungsprodukte sind in beiden Fällen identisch  
(Weinblum und Johns (8), Blackburn und Davies (9),  
Weinblum (10)) und zeigen hauptsächlich die in der  
Abbildung 2 wiedergegebene Struktur (11).

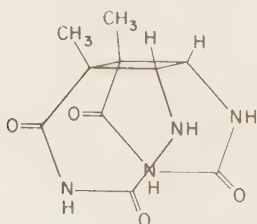


Abb. 2: Dimeres Thymin, cis-syn-Form

Wulff und Fraenkel (12) geben nach in vitro-Bestrahlung  
vier stereoisomere Formen des dimeren Thymins an.

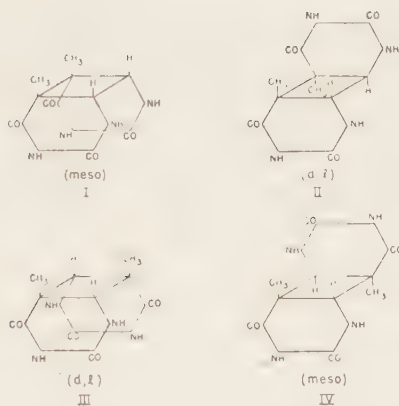


Abb. 3: Vier stereoisomere Formen des Thymins  
(nach Wulff und Fraenkel (12))

I = cis - syn - Form

II = trans - syn - Form

III = cis - anti - Form

IV = trans - anti - Form

In vivo kommt nach einer Untersuchung von Weinblum und Johns (8) nur die cis-syn-Konfiguration vor.

### 1.3 Allgemeine Strahlenwirkung

Durch Strahlung wird Energie zugeführt, die die Moleküle verändert. Es treten chemische Reaktionen auf, die den Ausgangspunkt zu biochemischen und damit auch biologischen Veränderungen bilden.

Die Entwicklung eines Strahlenschadens durch Einwirkung ionisierender Strahlen läßt sich nach Flatzmann (13) in vier Zeitabschnitte zerlegen.

#### 1. Physikalische Phase ( $10^{-13}$ sec)

Durch Strahlung wird Energie an die Materie übertragen. Es entstehen dabei zum überwiegenden Teil elektronisch angeregte oder ionisierte Moleküle.

#### 2. Physikochemische Phase ( $10^{-10}$ sec)

Die aus 1 entstandenen instabilen Primärprodukte erzeugen spontan oder durch Zusammenstoß mit Umgebungsmolekülen reaktionsfähige freie Atome oder Radikale.

#### 3. Chemische Phase ( $10^{-6}$ sec)

Wenn ein thermisches Gleichgewicht erreicht ist, reagieren die aktivierten Moleküle der Phase 2 untereinander oder mit ihrer Umgebung.

#### 4. Biologische Phase (bis zu mehreren Jahren)

Durch molekulare Veränderungen im biologischen Objekt und Störungen dieses Systems können sich im Verlauf der biologischen Phase die schließlich zu beobachtenden biologischen Wirkungen ausbilden.

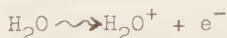
### 1.3.1 Direkter und indirekter Strahleneffekt

"Direkter Effekt" bedeutet, daß die Strahlenenergie direkt von dem zu untersuchenden Objekt absorbiert wird. Bei der indirekten Strahlenwirkung wird die Strahlung primär in der Umgebung eines betrachteten Biomoleküls absorbiert. Die Wirkung kann dann durch intermolekulare Energieleitung oder über die Abspaltung diffusibler Radikale, z.B. Wasserstoffatome, auf das Biomolekül übertragen werden.

### 1.3.2 Radiolyse des Wassers und die Primärreaktionen der Bestrahlungsprodukte

Da das monomere und dimere Thymin bei den Versuchen dieser Arbeit in wässriger Lösung bestrahlt wird, ist es wichtig, hierauf näher einzugehen.

Durch Absorption von Strahlungsenergie werden primär Wassermoleküle ionisiert.



Das dabei entstehende positive Ion kann nach folgender Gleichung OH-Radikale liefern.



Die Reaktion der Elektronen mit den Wassermolekülen führt zur Erzeugung von H-Atomen.



Die Radikale  $\text{H}^{\bullet}$  und  $\text{OH}^{\bullet}$  können außerdem durch Elektronenanregung und Dissoziation direkt entstehen.



Biologisch wichtig sind die freigesetzten Elektronen, die einen Teil der benachbarten Wassermoleküle polari-

sieren können und sich dadurch als sogenannte hydratisierte Elektronen ( $e^-_{aq}$ ) stabilisieren.

In dieser Form können sie über längere Distanzen diffundieren und mit gelösten Biomolekülen reagieren.

Es entstehen bei der Radiolyse des Wassers die drei biologisch bedeutsamen "Wasserradikale":  $H^\bullet$ ,  $OH^\bullet$  und  $e^-_{aq}$ . Durch Rekombination dieser Wasserradikale entstehen als Sekundärprodukte außerdem noch  $H_2$ ,  $H_2O$  und  $H_2O_2$  (14).

Unterschiedliche Energie und Strahlenqualität der ionisierenden Strahlung bewirken eine bestimmte Verteilung der freien Radikale (Fritz-Miggli (42)). Je energiereicher die Strahlung ist, desto weiter liegen die gebildeten Ionen und damit die Radikale auseinander.

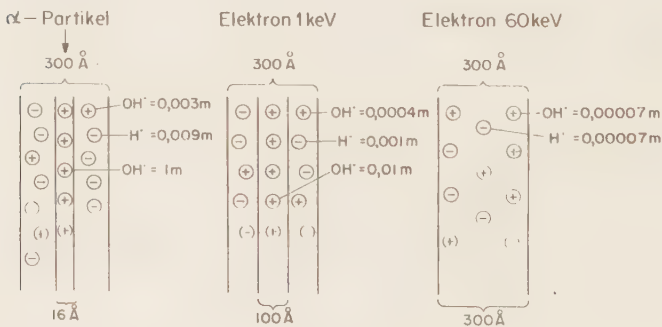


Abb. 4: Verteilung der positiven und negativen Wassermoleküle bzw. freien Radikale beim Durchgang eines Alpha-Partikels, eines Elektrons von 1 keV und von 60 keV (aus Fritz-Miggli (42))

Durch den unterschiedlichen Abstand bedingt, kommt es zu unterschiedlicher quantitativer Verteilung der Sekundärprodukte. So stellt sich bei der dichter ionisierenden Strahlung die Reaktion



leichter ein, und die freien Radikale sind nur kurzlebig.

Bei der energiereicheren, dünner ionisierenden Strahlung überwiegt die Rückbildungsreaktion



und die freien Radikale sind langlebiger. Dies ist unter Umständen ein Grund für die unterschiedliche relative biologische Wirksamkeit (REW). In der Diskussion wird dies noch näher ausgeführt.

### 1.3.3 Der Sauerstoffeffekt

Die eigenen Versuche werden unter Rühren bei Luftzutritt durchgeführt. Der Sauerstoff in der wässrigen Lösung kann zu folgenden Reaktionen führen (14).



Röntgenstrahlen wirken dabei oxydierend und es bildet sich unter diesen Bedingungen Wasserstoffperoxyd. Wasserstoffperoxyd reagiert mit Thymin. Es kann dabei, wie Pauzisch et al. (15,16) nachweisen, zur Zerstörung des Pyrimidinringes kommen, unter Bildung von Acetol und Harnstoff (s. Abb. 5).

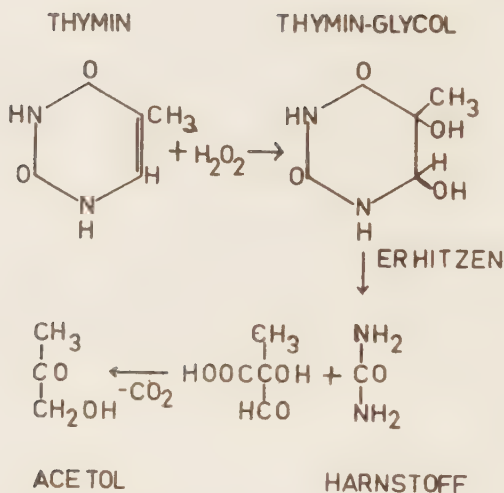


Abb. 5: Reaktion von Thymin mit Wasserstoffperoxyd zu Acetol und Harnstoff

Wacker und Gerstenberger (17) beobachteten im Zusammenhang mit Versuchen zur Photoreaktivierung, daß dimeres Thymin in Anwesenheit von 3%  $H_2O_2$  in wässriger Lösung durch Licht aufgespalten wird. Wasserstoffperoxyd bewirkt außerdem noch eine verstärkte Photoreaktivierung bei UV-inaktivierten Bakterien.

#### 1.4 Wirkung der UV-Strahlung auf Nucleinsäuren, insbesondere auf Thymin

UV-Licht bewirkt im Gegensatz zur Röntgenstrahlung und Elektronenstrahlung eine Dimerisation von Pyrimidinen (43).

Beukers und Berends (3,4) stellen erstmals eine Dimerisation des Thymins in gefrorener wässriger Lösung bei Bestrahlung mit UV-Licht fest. Durch Einfrieren der Lösung wird eine Fixierung der Moleküle und damit eine Nachahmung des Zustandes in der DNS erreicht. Es findet in der DNS keine 100% ige Dimerisation des Thymins statt, da nur die in der DNS benachbarten Thyminmoleküle eines Stranges miteinander reagieren können. So finden Beukers und Berends auch keinen Unterschied bei der Bestrahlung von DNS in gefrorener und in aufgetauter wässriger Lösung.

Wacker et al. (7, 21, 22, 23) bestätigen diese Ergebnisse. Bei der Untersuchung der Wirkung des UV-Lichtes auf Bakterien und Thymin-2-<sup>14</sup>C-markierte DNS finden sie dimeres Thymin und zwei weitere Photoprodukte.

Aus Cytosin entstehen Uracil und ebenfalls zwei weitere Photoprodukte. Sie erhalten auch Uridin- und Cytosin-Dimere, wobei letztere zu entsprechenden Uracildimeren desaminiert werden. Erst 1971 gelingt Varghese (18) der Nachweis von Cytosin-Dimeren durch UV-Bestrahlung gefrorener Cytosinribosidlösung.

Es entstehen auch Mischdimere aus Uracil und Thymin und Cytosin und Thymin (Weinblum (24)), wobei nach der Hydrolyse der DNS aus Cytosin wieder Uracil entsteht.

Nur das Thymindimere wird neben anderen Thymin-Photoprodukten durch Bestrahlung in wässriger Lösung

wieder zu 87% in monomeres Thymin (T) gespalten (23).

Dimerisation und Wiederaufspaltung sind, wie Setlow (31) und Lochmann (25) beschreiben, von Dosis und Wellenlänge des eingestrahnten UV-Lichtes abhängig.

Es tritt in der gefrorenen Lösung ein Gleichgewicht ein, das bei 235 nm bei über 90% T und bei 254 nm bei über 90% TT liegt.

Moore (27) findet 1958 bei Untersuchungen über die allgemeine UV-Strahlenwirkung in wässriger Lösung, daß bei der Bestrahlung mit UV-Licht eine Anlagerung von Wasser an die 5,6-Doppelbindung bei Pyrimidinen stattfindet, wie es bereits Sinsheimer und Hastings (28) 1949 vermutet hatten.

Nach einer Untersuchung von Danilov (29) aus dem Jahr 1967, verläuft die Dimerisation über einen Triplet-Zustand.

#### 1.5. Die Wirkung ionisierender Strahlung auf DTS und dimeres Thymin — bisherige Arbeiten und Ergebnisse

1961 untersucht Weinblum (24) die Wirkung von Röntgenstrahlen auf Nucleinsäuren. Bei der Bestrahlung von 2-<sup>14</sup>C-markiertem Thymin entstehen vier Bestrahlungsprodukte, von denen drei durch Erhitzen wieder zerfallen und zu Harnstoff weiterreagieren.

Es handelt sich dabei um Thyminglycoll, das in Acetol und Harnstoff zerfällt.

Lochmann (25, 32, 33) bestimmt 1962 den Grad der Umwandlung von Thymin-2-<sup>14</sup>C durch Röntgenstrahlen, indem er den entstehenden radioaktiven Harnstoff mißt.

Nach der Bestrahlung einer wässrigen 15µg/ml T-2-<sup>14</sup>C-

Lösung mit 1200 krad einer 50 kV-Röntgenstrahlung stellt er mit Hilfe der Papierchromatographie 31% Thymin, 58% Harnstoff und 11% einer nicht identifizierten Verbindung fest (32). Wie später noch gezeigt wird, ist die Zerstörung des monomeren Thymins zu Harnstoff bei der Bestrahlung von TT wesentlich geringer.

Lochmann stellt eine starke Abhängigkeit der Spaltung vom umgebenden Milieu fest. Je mehr sich das Milieu den Verhältnissen *in vivo* nähert, desto geringer ist die Zerstörung *in vitro*.

Der Zerstörungseffekt nach Bestrahlung *in vivo* beträgt nur etwa 1% des Effektes nach Bestrahlung *in vitro*.

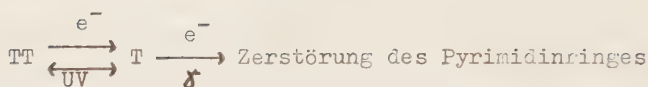
Es besteht in der Zelle ein guter Schutz für die Nucleinsäurebasen gegenüber der Strahlenwirkung.

Ausgeübt wird dieser Schutz durch Proteine und gelöste Salze.

Im Gegensatz zur UV-Strahlung bewirkt die ionisierende Strahlung keine Dimerisation von Nucleinsäuren.

1963 gelingt Schmidt, Hartmann, Großgebauer und Schumacher (34) erstmals die Spaltung von TT und wenig später auch von dimerem Uracil (UU)(35) in monomeres durch ionisierende Strahlung, wie sie beim TT von Beukers und Berends (4) auf Grund massenspektrographischer Untersuchungsergebnisse schon vermutet worden war.

Dabei werden in einer 150 µg/ml TT-Lösung 40% des durch UV-Bestrahlung entstandenen dimeren Thymins durch 200 krad einer 34 MeV-Elektronenstrahlung wieder in monomeres aufgespalten. Da nur weniger als 2% des entstandenen T zerstört werden, erfolgt die Spaltung des Pyrimidinringes anscheinend nur in monomerer Form. Dies ist damit zu erklären, daß die Bindungsenergie des Cyclobutanringes geringer als die des Pyrimidinringes ist.



Dieselbe Beobachtung macht auch Lochmann (35), der auf Anregung obiger Autoren die Spaltung von radioaktivem TT in wässriger Lösung mit 50 kV-Röntgenstrahlen durchführt.

Nach Bestrahlung einer 200 µg/ml TT-Lösung mit 200 krad zeigt die papierchromatographische Verteilung der Radioaktivität ca. 85% TT, 14% T, <1% Harnstoff und <1% einer nicht identifizierten Verbindung.

Es gelingt ihm nicht, eine Spaltung von TT in bakterieller DNS durch Röntgenstrahlen nachzuweisen.

Über eine Spaltung von TT in E.coli B<sub>8-1</sub> durch schnelle Elektronen berichten 1968 Greulich, Hartmann und Schmidt (36, 37). Etwa 15% des in den Bakterien durch UV-Strahlung erzeugten TT werden durch 100 krad 34 MeV-Elektronen wieder in monomeres Thymin gespalten.

Deering und Snipes (38) veröffentlichen 1965 Untersuchungen über die Einwirkung von <sup>60</sup>Co-γ-Strahlung auf wässrige Lösungen von TT unter N<sub>2</sub>- oder O<sub>2</sub>-Atmosphäre.

Nach Bestrahlung mit 130 krad unter O<sub>2</sub>-Atmosphäre finden sie 8,4%, unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre 18,4% T, bei einer Lösungskonzentration von 250 µg/ml TT.

Für die Spaltung geben sie das in Abbildung 6 dargestellte vereinfachte Schema an.

Danach reagiert der Sauerstoff mit dem Thyminradikal, so daß unter O<sub>2</sub>-Einwirkung aus TT nur ein monomeres Thymin entsteht, während bei N<sub>2</sub>-Einwirkung zwei monomere Thyminmoleküle entstehen.

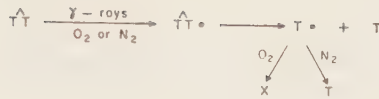


Abb. 6: Spaltung von TT durch  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung  
 unter  $\text{O}_2$ - und  $\text{N}_2$ -Atmosphäre  
 (nach Deering und Snipes (38))

1969 berichten Snipes und Deering (39) über die äußerst wirkungsvolle Spaltung von TT in kristalliner Form durch  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung.

Nach Bestrahlung mit 100 krad ist biochemisch kein TT mehr nachweisbar. Die atmosphärische Zusammensetzung zeigt keinen Einfluß. Der G-Wert für die Erzeugung der Thyminmoleküle wird mit 1040 errechnet.

Weinblum (40) kommt in eigenen Untersuchungen 1969 zu ähnlichen Ergebnissen. Er findet bei der Bestrahlung von dimerem Dimethylthymin mit  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlen sehr hohe G-Werte, für das cis-syn-Isomere einen Wert von 6300 im Kristall und von 1000 im kristallinen Pulver.

## 1.6 Biologische Bedeutung der Dimerisation in Nucleinsäuren durch die Einwirkung von UV-Strahlen

Die durch UV-Strahlen verursachten biologischen Schäden in der Bakterienzelle sind weitgehend auf die Bildung von TT zurückzuführen (23).

Durch die Dimerisation von Thyminmolekülen innerhalb des DNS-Stranges wird die identische Reduplikation bei der Zellteilung gestört. Bollum und Setlow (30) diskutieren verschiedene mögliche Folgen einer durch UV-Licht bewirkten Thymindimerisierung für die DNS-Reduplikation.

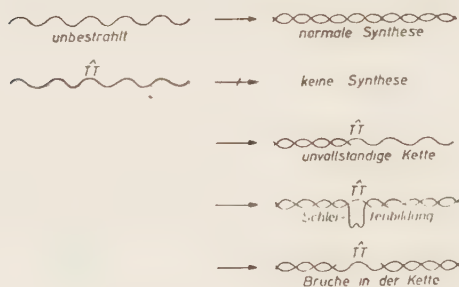


Abb. 7: Verschiedene diskutierte Folgen einer durch UV-Licht bewirkten Thymindimerisierung der DNS für die DNS-Reduplikation (nach Bollum und Setlow (30))

Die Folgen sind eine Mutation oder das Absterben der Zelle. Im Versuch zeigt sich dies direkt in der Zunahme der gebildeten Dimere mit abnehmender Überlebensrate (21, 24, 25).

Die Bildung von TT durch UV-Bestrahlung kann durch verschiedene Mechanismen zum Teil wieder rückgängig gemacht werden. Bekannt sind bisher die Photoreaktivierung,  $H_2O_2$ -Reaktivierung und enzymatische Reaktivierungen.

Eine Spaltung des TT in der Bakterienzelle durch schnelle Elektronen weisen Greulich, Hartmann und Schmidt (36, 37) 1968 an E.coli B<sub>S-1</sub> nach. Sie ist als Ursache für einen antagonistischen Effekt zwischen UV- und ionisierender Strahlung anzunehmen (41).

Bunke (20) erzielt denselben Effekt der Bakterieninaktivierung und Reaktivierung auch bei der Anwendung von 200 kV-Röntgenstrahlen.

#### 1.7 Biologische Wirkung unterschiedlicher Arten ionisierender Strahlung

Nach Szybalski (44) sind drei Mechanismen für die Strahlenwirkung auf DNA-Moleküle in wässriger Lösung zu unterscheiden.

1. Direkte Treffereffekte, die sich vor allem in der Trennung von Phosphorsäureesterbindungen, d.h. Strangbrüchen äußern.
2. Indirekte Effekte, die  $O_2$ -unabhängig sind und über einen Radikaltyp  $R_1$  vor sich gehen. Diese führen ebenfalls zu Strangbrüchen.
3. Indirekte Effekte, die  $O_2$ -abhängig sind und über einen Radikaltyp  $R_2$  ablaufen. Sie führen zu chemischen Veränderungen der Nucleotide, besonders zu denen der Thyrimidine.

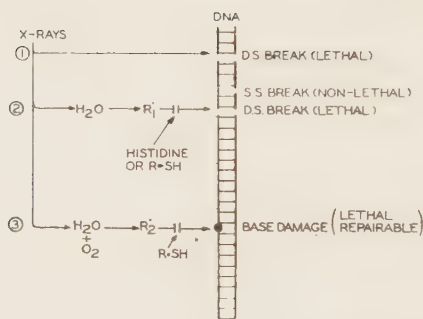


Abb. 8: Drei unterschiedliche Effekte der ionisierenden Strahlung auf DNS-Moleküle in wässriger Lösung

D.S.Break = Doppelstrangbruch

S.S.Break = Einzelstrangbruch

(nach Szybalski (44))

Die unterschiedliche biologische Wirksamkeit zweier qualitativ verschiedener Strahlenarten wird durch die RBW angegeben (Fritz-Niggli (42)).

Um die RBW energiereicher Strahlen anzugeben, wird die biologische Wirkung der konventionellen energiearmen Röntgenstrahlung bei gleicher Ionisationsdichte mit 1 angenommen.

Die Wirkung unterschiedlicher Ionisierender Strahlen wird von verschiedenen Autoren an unterschiedlichen biologischen Objekten untersucht, so z.B. an E.coli in Bezug auf die Überlebensrate, an Rattenschwänzen, wobei das Längenwachstum verglichen wird, an Drosophilaembryonen, Gerstenkeimlingen, Wurzelspitzen u.s.w.

Eine Zusammenstellung von 70 Werten der RBW, gemessen in den Jahren 1945 bis 1963 von unterschiedlichen Autoren, mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten und an unterschiedlichen Objekten ist in "Ergebnisse der

medizinischen Strahlenforschung" (19) zusammengestellt.

Wenn auch nach Fritz-Niggli (42) "in Anbetracht der verschiedenen Schwierigkeiten auf den zahlenmäßigen Wert der sogenannten REW nicht allzu großes Gewicht gelegt werden darf", so ergibt sich doch im Durchschnitt der Versuche mit unterschiedlichen biologischen Objekten;

aß die biologische Wirksamkeit der hochenergetischen Strahlen geringer ist. So beträgt die REW der 35 MeV-Elektronen 0,8 gegenüber 1 der Röntgenstrahlen.

## 2 Ziel der eigenen Untersuchungen

In der vorliegenden Arbeit soll durch Bestrahlung unter konstanten Bedingungen die Spaltung von dimerem Thymin in monomeres durch 34 MeV-Elektronen und Röntgenstrahlen unterschiedlicher Energie untersucht werden.

Weiterhin soll die Bildung von monomerem Thymin aus TT in Abhängigkeit von der TT-Konzentration, der Dosisleistung und der Temperatur untersucht werden.

Es soll geprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Wirkung unterschiedlicher ionisierender Strahlen auf die Thyminbildung aus TT und der REW dieser Strahlen besteht.

Am Beispiel des Cysteins soll die Schutzwirkung von Proteinen bei der TT-Spaltung in monomeres Thymin nachgewiesen werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Herstellung von dimerem Thymin

Die Herstellung des dimeren Thymins geschieht in Anlehnung an das von Deering und Snipes (38) angegebene Verfahren.

Eine gefrorene wässrige 400  $\mu\text{g/ml}$  T-Lösung (Thymin für biochemische Zwecke in kristalliner Form von Fa. Merck, Darmstadt, Mol.-Gew. 126,12) wird in flachen Glasschalen (Durchmesser = 18 cm) bei einer Schichtdicke von 2 mm und unter Kühlung mit Trockeneis 70 Minuten lang mit UV-Licht bestrahlt.

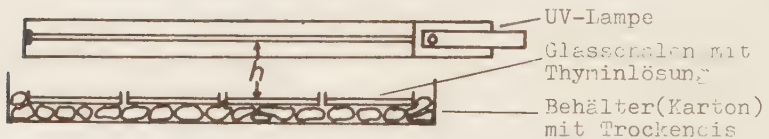


Abb. 9: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur UV-Bestrahlung

Der Abstand zwischen UV-Lampe und Lösungsoberfläche beträgt  $h = 6 \text{ cm}$ , die Dosis des in 70 Minuten einbestrahlten UV-Lichtes von vorwiegend 254 nm beträgt  $1,19 \cdot 10^6 \text{ erg/mm}^2$ . Die Ausbeute an TT liegt bei ca. 90%.

Nach der Bestrahlung wird die aufgetaute Lösung im Wasserbad schonend auf ca.  $1/6$  des Ausgangsvolumens eingeeengt, anschließend filtriert (Sartorius Membranfilter SM 11307) und über Nacht in den Kühlschrank ( $+ 4^\circ\text{C}$ ) gestellt. Dabei kristallisiert das TT, dessen Löslichkeit bei Raumtemperatur nur  $1/8$  derjenigen des Thymins (TT: 0,5 g/l, T: 4 g/l  $\text{H}_2\text{O}$ ) beträgt, in feinen weißen Nadeln aus (Wulff und Fraenkel (12)).

Der Niederschlag wird abfiltriert, mit wenig Aqua tridest gelöst und erneut über Nacht stehengelassen. Nach viermaligem Umkristallisieren wird der Niederschlag auf dem Filter im Exsiccator getrocknet.

Zur Kontrolle der Reinheit des gewonnenen TT werden wässrige Lösungen von 5, 10, 15, 20, 25 und 100 µg/ml TT hergestellt und spektralphotometrisch im Bereich von 200 - 300 nm gemessen (Abb. 13).

Das UV-Spektrum zeigt in diesem Bereich kein Maximum mehr, sondern fällt kontinuierlich zur Abszisse ab. Die Kurven stimmen mit den aus der Literatur bekannten (Deering, Snipes (38), Setlow (31), Wulff und Fraenkel (12)) überein. Danach enthält das gewonnene TT unter 0,1 % ...

#### 3.1.1 UV-Bestrahlung

Zur Bestrahlung wird eine Quecksilber-Niederdrucklampe HK 30/89 - PL 390, der Quarzlampengesellschaft Hanau, 0,35 Amp, 220 V verwendet, die vorwiegend Licht der Wellenlänge 253,7 nm abgibt.

Die Röhrenlänge beträgt 80 cm.

### 3.2 Röntgenbestrahlung

Die Bestrahlung wird an zwei Geräten mit folgenden Bedingungen durchgeführt.

I Röntgengerät : Müller MG 150

Röntgenröhre : MÖD 151/Be

Bedingungen : A. 25 kV, 20 mA

B. 35 kV, 30 mA

C. 130 kV, 13,5 mA

ohne Filter, großer Brennfleck,  
121 mm Abstand Brennfleck — Lösungs-  
oberfläche

D. 180 kV, 13,5 mA

2 mm Al-Filter, 180 mm Abstand  
Brennfleck — Oberfläche der Lösung

II Röntgengerät : Müller RT 250, Typ 70255/13

Bedingungen : 250 kV, 15 mA

Leerfilter, ohne Tubus, 200 mm Abstand  
Antikathode — Oberfläche der Lösung

Für die Bestrahlung werden jeweils 10 ml, bzw. 8 ml einer 100 µg/ml TT-Lösung in eine Kunststoffpetrischale von 52 mm Durchmesser gefüllt. Das ergibt eine Schichtdicke von 4,7 mm bei 10 ml und 3,8 mm bei 8 ml Füllung.

Die Proben stehen im Wasserbad, einem Glasgefäß von 22,5 cm Durchmesser und 6 cm Höhe. Die Wasserfüllung von 2500 cm<sup>3</sup> wird bei Versuchsbeginn auf die gewünschte Temperatur gebracht. Die Temperatur der Proben bleibt während der Bestrahlung bis auf  $\pm 1^{\circ}\text{C}$  konstant.

Die Proben werden bei 30°, 25° oder 36°C unter Rühren mit dem Magnetrührer bestrahlt.

### 3.3 Elektronenbestrahlung

Als Strahlenquelle dient ein Asklepitron 35 der Fa. Brown, Boverie und Cie AG. Mannheim.

Energie : 34 MeV

Strahlungsart :  $\beta^-$

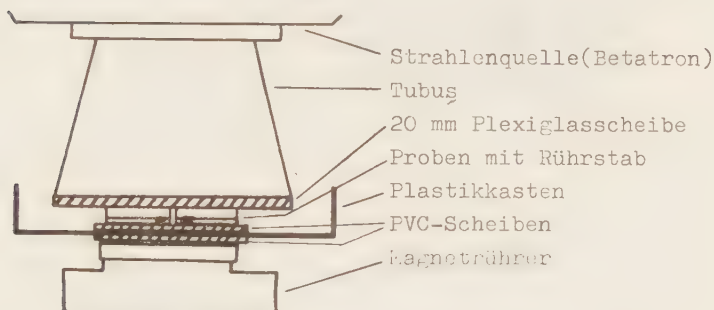


Abb. 10: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung A zur Elektronenbestrahlung

#### Versuchsanordnung A:

Es werden zwei Proben gleichzeitig bestrahlt. Dabei befinden sich je Probe 8 ml einer wässrigen 100  $\mu\text{g/ml}$  ET-Lösung in einer Kunststoffschale von 52 mm Durchmesser, bei einer Schichtdicke von 3,8 mm.

Die Proben werden während der Bestrahlung gerührt mit einem Magnetrührer. Unmittelbar über den Proben befindet sich eine 20 mm dicke Plexiglasscheibe. Dadurch wird eine maximale Energieabsorption in der Lösung bewirkt, da die Tiefendosiskurve der 34 MeV-Elektronen nach Durchgang durch 2 cm Plexiglas ihr Maximum erreicht.

Der Abstand zwischen Strahlenquelle und Oberkante der Plexiglasscheibe beträgt 110 cm. Die mittlere Dosisleistung bei diesem Abstand beträgt 480 rad/min. Die Bestrahlung findet bei 25°C statt.

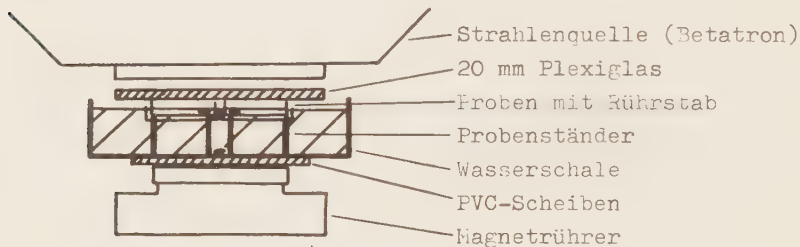


Abb. 11: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung B zur Elektronenbestrahlung

#### Versuchsanordnung B:

Die Proben mit 8 ml/Schale werden bei konstanten Temperaturen von 3°, 25° und 36°C bestrahlt, Zwei Proben werden gleichzeitig in einem Wasserbad bestrahlt. Unmittelbar über den Proben befindet sich eine 20 mm dicke Plexiglasscheibe.

Die Rührstäbchen bewegen sich auf Grund der gegenseitigen Anziehungskraft nicht, die Proben können deshalb nicht gerührt werden.

Durch Abnahme des Tubus wird der Normalabstand von 110 cm auf 93 cm verkürzt. Die mittlere Dosisleistung erhöht sich dadurch um den Faktor 1,4 auf 680 rad/min.

### 3.4 UV-Dosimetrie

Für die UV-Dosimetrie werden im Labor vorhandene Eichkurven übernommen. Die Messung der Dosis beruht auf der Umwandlung von UV-Licht in eine Fluoreszenzstrahlung unter Verwendung von Uramine A. Die Fluoreszenzstrahlung wird photoelektrisch gemessen. Bei einem Abstand von 6 cm ergeben sich  $1,7 \cdot 10^4$  erg/min mm<sup>2</sup>.

Für 70 min UV-Bestrahlung beträgt die eingestrahelte Energie  $1,19 \cdot 10^6$  erg/mm<sup>2</sup>.

### 3.5 Röntgen-Dosimetrie

Unter Beibehaltung der einzelnen Versuchsanordnungen wird die Fricke-Dosimetrie vorgenommen.

Die zu bestrahlenden TT-Lösungen werden ersetzt durch eine Lösung von  $10^{-4}$  molar  $(\text{NH}_4)_2 \text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  und  $10^{-3}$  molar  $\text{NaCl}$  in 0,1 n  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Die Extinktionsänderung der Lösung bei 305 nm (25°C, 4,7 mm Schichtdicke) wird in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit aufgetragen.

Die Dosisleistung wird berechnet nach der Formel:

$$D = \frac{1,602 \cdot 10^{-15} \cdot N \cdot E}{E_M \cdot D \cdot G} \quad \text{rad}$$

$1,602 \cdot 10^{-15}$  = Umrechnungsfaktor eV in erg  $\cdot 10^{-3}$

N = Loschmidtsche Zahl =  $6,02 \cdot 10^{23}$  mol<sup>-1</sup>

E = Extinktion, gemessen bei 25°C

$E_M$  = molare Extinktion von  $\text{Fe}^{+++}$ ,  
gemessen in 0,1 n  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bei 25°C = 2190

D = relative Dichte von 0,1 n  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bei  
25°C = 1,00 g/ml

G = radiochemische Ausbeute von  $\text{Fe}^{+++}$ -  
Ionen pro 100 eV.

Zur Berechnung der Dosis werden folgende G-Werte verwendet.

|          |           |
|----------|-----------|
| 25 kV :  | G = 13,73 |
| 35 kV :  | G = 13,8  |
| 130 kV : | G = 14,4  |
| 250 kV : | G = 15,1  |

Für eine Probe mit 10 ml, bzw. 8 ml, werden folgende Dosisleistungen gemessen und errechnet. Es gelten dabei die unter 3.2 angegebenen Bedingungen.

- A : 25 kV, 20 mA, 121 mm Abstand  
Dosisleistung = 31,7 rad/sec = 1,9 krad/min
- B : 35 kV, 30 mA, 121 mm Abstand  
Dosisleistung = 78 rad/sec = 4,7 krad/min
- C : 130 kV, 13,5 mA, 121 mm Abstand  
Dosisleistung = 125 rad/sec = 7,49 krad/min
- D : 130 kV, 13,5 mA, 180 mm Abstand  
2 mm Al-Filter  
Dosisleistung = 11 rad/sec = 0,66 krad/min
- E : 250 kV, 15 mA, 200 mm Abstand  
Dosisleistung = 22 rad/sec = 1,3 krad/min

### 3.6 34 MeV-Elektronen-Dosimetrie

Die Dosismessungen werden wie bei der Röntgendosimetrie vorgenommen, mit folgenden Abweichungen.

0,8 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anstelle von 0,1 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

E<sub>M</sub> = 2201 anstelle von 2190

$D = 1,027$  anstelle von  $1,00$  g/ml

$G = 15,1$  Ionen  $\text{Fe}^{+++}$  pro  $100$  eV (G-Wert der International Atomic Energy Agency für  $35$  MeV-Elektronen)

Für  $24 \cdot 10^3$  Anzeige-Einheiten ("kiks") des Gerätes werden z.B. bei der Versuchsanordnung A  $23$  krad, bei der Versuchsanordnung B  $32,5$  krad gemessen, bzw. errechnet.

### 3.7 Spektralphotometrische Extinktionsmessung

Die Extinktion der bestrahlten Lösung wird mit dem Spektralphotometer PMQ 2 der Fa. Carl Zeiss gemessen. Als Lichtquelle dient eine Wasserstofflampe H 30 ohne Filter. Die Proben werden in Quarzküvetten von  $1$  cm Schichtdicke gemessen.

### 3.8 pH-Messung

Zur pH-Messung wird das pH-Meter E 150 A Metrohm-AG, Herisau, Schweiz, verwendet. Zur Eichung dient eine Phosphat-Pufferlösung pH  $6,88$  ( $0,025$  M) der Fa. Merck.

### 3.9 Bestimmung des Schmelzpunktes von TT

Kristalline TT-Trockensubstanz wird in feinen Glaskapillaren im Schmelzblock erhitzt. Bei  $345^\circ\text{C}$  schmilzt TT unter Zersetzung.

#### 4 Eigene Versuchsergebnisse

##### 4.1 Spektralphotometrische Bestimmung der Extinktion von monomerem Thymin in Abhängigkeit von der Wellenlänge

Abbildung 12 zeigt die Extinktion monomerer wässriger Thyminlösungen unterschiedlicher Konzentration im Wellenlängenbereich von 210 - 300 nm. Es werden Konzentrationen von 5, 10, 15, 20 und 25  $\mu\text{g T/ml}$  gewählt, um bei 1 cm Schichtdicke der Quarzküvetten messbare Werte im Anzeigebereich des verwendeten Spektralphotometers zu erhalten. Der pH-Wert der ungepufferten Thyminlösung beträgt 5,5, die Temperatur bei der Messung  $23^{\circ}\text{C} \pm 1$ . Die Extinktion ist abhängig von der Konzentration. Die Extinktionsmaxima liegen bei 264 nm. Damit stimmt der Kurvenverlauf mit den aus der Literatur bekannten Werten (26, 12) überein.

##### 4.1.2 Spektralphotometrische Bestimmung der Extinktion von dimerem Thymin in Abhängigkeit von der Wellenlänge

In Abbildung 13 ist die Extinktion dimerer wässriger Thyminlösungen unterschiedlicher Konzentration in Abhängigkeit von der Wellenlänge im Bereich von 200 - 300 nm aufgetragen. Die Konzentration der Lösungen beträgt 5, 10, 15, 20, 25 und 100  $\mu\text{g TT/ml}$ . Bei 264 nm ist im Gegensatz zum monomeren Thymin kein Maximum mehr vorhanden. Die Kurven fallen kontinuierlich zur Abszisse hin ab und stimmen damit auch mit den in der Literatur angegebenen Ergebnissen überein (4, 12, 26).

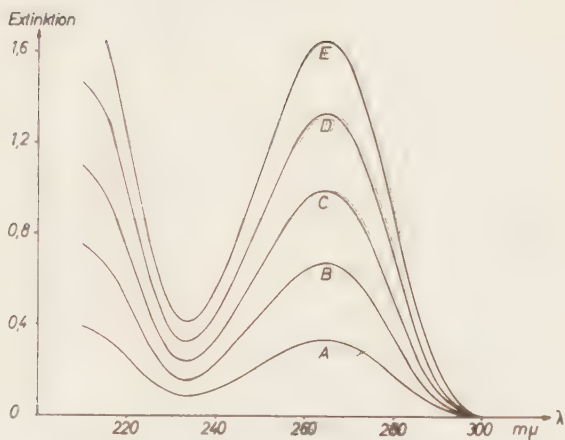


Abb. 12: Extinktion monomerer Thyminlösungen unterschiedlicher Konzentrationen in Abhängigkeit von der Wellenlänge

Kurve A: 5  $\mu\text{g/ml}$  Thymin  
" B: 10  $\mu\text{g/ml}$  "  
" C: 15  $\mu\text{g/ml}$  "  
" D: 20  $\mu\text{g/ml}$  "  
" E: 25  $\mu\text{g/ml}$  "

pH-Wert : 5,5

Temperatur:  $23^{\circ}\text{C} \pm 1$

Die Meßpunkte liegen auf den gezeichneten Kurven, sie haben am Maximum bzw. Minimum einen Abstand von 2 nm, an den übrigen Kurvenabschnitten einen Abstand von 5 nm.

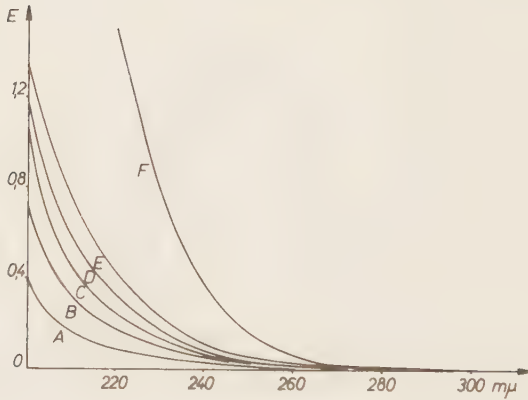


Abb. 13: Extinktion dimerer Thyminlösungen unterschiedlicher Konzentration in Abhängigkeit von der Wellenlänge

Kurve A: 5  $\mu\text{g/ml}$  TT  
" B: 10  $\mu\text{g/ml}$  TT  
" C: 15  $\mu\text{g/ml}$  TT  
" D: 20  $\mu\text{g/ml}$  TT  
" E: 25  $\mu\text{g/ml}$  TT  
" F: 100  $\mu\text{g/ml}$  TT

pH-Wert : 5,5

Temperatur:  $23^{\circ}\text{C} \pm 1$

Die Meßpunkte liegen auf den gezeichneten Kurven, sie haben bei 230 - 240 nm einen Abstand von 2 nm, in den übrigen Kurvenabschnitten einen Abstand von 5 nm.

#### 4.1.3 Spektralphotometrische Bestimmung der Extinktion von dimerem Thymin in Abhängigkeit von der Wellenlänge, in Gegenwart unterschiedlicher Mengen von monomerem Thymin

Einer wässrigen 100 µg/ml TT-Lösung werden 1, 2, 3, 4, 5 und 10% einer 100 µg/ml T-Lösung zugegeben und die Extinktionen im Bereich von 200 - 300 nm gemessen. Die Extinktion bei 264 nm steigt mit Zunahme des Anteils an monomerem Thymin kontinuierlich an.

Der Gehalt von 1% T bewirkt einen deutlichen Extinktionsunterschied gegenüber reiner TT-Lösung. Bereits bei 2% T kommt es zur Ausbildung eines Maximums.

Das Diagramm (Abb. 14a + b) ist zugleich ein Beweis für den Reinheitsgrad des gewonnenen dimeren Thymins.

Die Extinktion der 100 µg/ml TT-Lösung beträgt bei 264 nm  $E_{T,264} = 0,045$ .

Die gleiche Extinktion hätte eine T-Lösung mit 0,75 µgT/ml (s. Abb. 12).

Geht man von der Hypothese aus, daß bei 264 nm die Extinktion einer 100 µg/ml TT-Lösung null beträgt, wenn die Lösung aus 100% reinem dimeren Thymin hergestellt wurde, so liegt der Anteil von monomerem Thymin in der für die Versuche dieser Arbeit hergestellten TT-Rein- substanz immer noch unter 0,75% T.

Ein Vergleich der Extinktionen bei 280 nm ergibt einen Wert unter 0,3% T, d.h. die Reinheit des gewonnenen dimeren Thymins liegt danach über 99,7%.

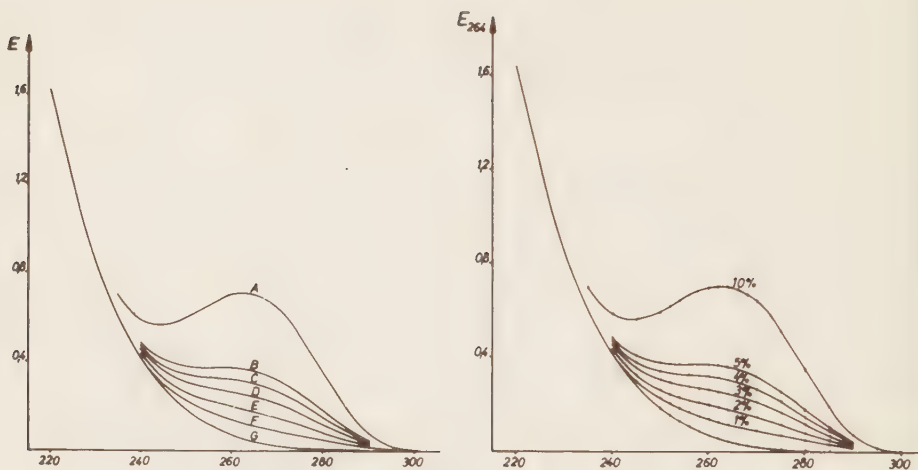


Abb. 14a + b: Extinktion einer dimeren Thyminlösung mit unterschiedlichen Anteilen von monomeren Thymin in Abhängigkeit von der Wellenlänge, am Beispiel einer 100 µg/ml T + TT-Lösung

Kurve A: 10% T + 90% TT  
 " B: 5% T + 95% TT  
 " C: 4% T + 96% TT  
 " D: 3% T + 97% TT  
 " E: 2% T + 98% TT  
 " F: 1% T + 99% TT  
 " G: 0% T = 100% TT

pH-Wert : 5,5

Temperatur: 23°C ± 1

Die Meßpunkte haben im Bereich 250 - 270 nm einen Abstand von 2 nm, in den übrigen Kurvenabschnitten einen Abstand von 5 nm. Die Meßpunkte liegen auf den gezeichneten Kurven.

4.2 Spektralphotometrische Ermittlung der Eichkurven für wässrige Lösungsgemische von monomerem und dimerem Thymin

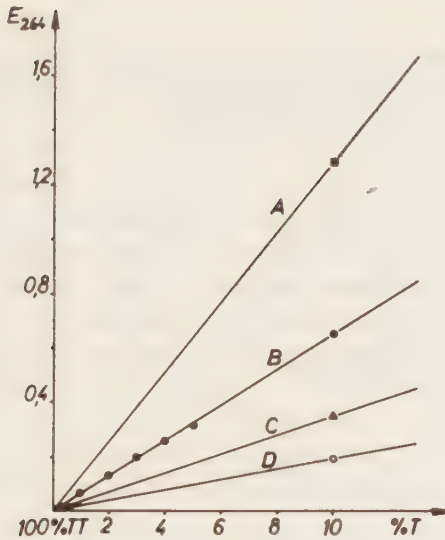


Abb. 15: Extinktion in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis aus dimerem und monomerem Thymin für verschiedene Konzentrationen

Kurve A: 200 µg/ml TT + T  
" B: 100 µg/ml TT + T  
" C: 50 µg/ml TT + T  
" D: 25 µg/ml TT + T

pH-Wert : 5,5

Temperatur: 25°C ± 1

Extinktionsmessung bei 264 nm

Zur Ermittlung der Eichkurven werden wässrige Lösungen von monomerem und dimerem Thymin in den Gesamtkonzentrationen von 25, 50, 100 und 200 µg/ml hergestellt.

Es werden jeweils Gemische aus TT und T in Abstufungen von 10% hergestellt und die Extinktionen bei 264 nm im Spektralphotometer gemessen (Abb. 15).

#### 4.3 Untersuchung verschiedener Faktoren auf ihre Wirkung bei der Spaltung von dimerem Thymin in monomeres durch Röntgenstrahlen

Durch Veränderung jeweils einer Größe, bei Konstanthaltung der übrigen, soll die Wirkung verschiedener Faktoren, wie z.B. die Konzentration der bestrahlten TT-Lösung, die Temperatur während der Bestrahlung, die Dosisleistung und die Wirkung von Proteinen auf die Spaltung von TT in T durch Röntgenstrahlen untersucht werden.

##### 4.3.1 Spaltung von dimerem Thymin in monomeres durch Röntgenstrahlen in Abhängigkeit von der Dosis und der TT-Konzentration

Wässrige, ungepufferte TT-Lösungen von 25, 50, 100 und 200 µg/ml werden in Proben zu jeweils 10 ml mit unterschiedlicher Dosis bestrahlt.

Es wird mit 130 kV-Röntgenstrahlen zwischen 0 und 27 Minuten bestrahlt. Die mittlere Dosisleistung beträgt 125 rad/sec. Die Temperatur der Proben wird während der Bestrahlung konstant auf  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$  gehalten (Versuchsanordnung zur Temperaturkonstanthaltung s. Material und Methoden (3.2)).

Im Anschluß an die Bestrahlung wird von jeder Probe die Extinktion bei einer Wellenlänge von 264 nm gemessen und der pH-Wert bestimmt. Es zeigt sich, daß mit steigender Dosis der pH-Wert abfällt.

Bei allen vier oben genannten Konzentrationen fällt der pH-Wert von 5,5 der unbestrahlten Lösung auf 4,3 bei einer eingestrahlten Dosis von 180 krad ab.

Abbildung 16 zeigt die Änderung der Extinktion der vier Lösungen mit unterschiedlicher Konzentration in Abhängigkeit von der eingestrahlten Dosis.

Alle vier Kurven zeigen ein Extinktionsmaximum und fallen anschließend ab.

Das Extinktionsmaximum bedeutet, daß in diesem Punkt die größte Menge an monomerem Thymin vorliegt. Es besteht ein Gleichgewicht zwischen Neubildung und Zerstörung des monomeren Thymins (33,34).

Bei längerer Bestrahlung überwiegt die strahlenchemische Veränderung des entstandenen monomeren Thymins, und es kommt zur Extinktionsabnahme.

Die Kurven unterscheiden sich in der Lage des Maximums und in der maximalen Menge an T.

| TT-Ausgangs-Konzentration | Lage des Maximums bei: | T-Gehalt im Maximum |
|---------------------------|------------------------|---------------------|
| 25 µg/ml                  | 35 krad                | 4,8 %               |
| 50 µg/ml                  | 68 krad                | 7,3 %               |
| 100 µg/ml                 | 115 krad               | 9,4 %               |
| 200 µg/ml                 | 180 krad               | 11,1 %              |

Tabelle 1: Lage des Maximums und T-Bildung im Maximum in Abhängigkeit von der Konzentration der bestrahlten Lösung

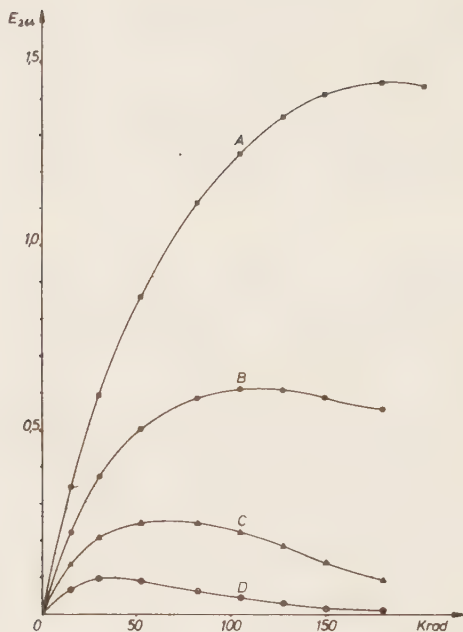


Abb. 16: TT-Spaltung, gemessen als Extinktion von T in Abhängigkeit von der Dosis und der TT-Konzentration der bestrahlten Lösung

|          |               |                |
|----------|---------------|----------------|
| Kurve A: | Anfangs-      | = 200 µg/ml TT |
| " B:     | konzentration |                |
| " C:     | "             | = 100 µg/ml TT |
| " D:     | "             | = 50 µg/ml TT  |
| " D:     | "             | = 25 µg/ml TT  |

Strahlung : 130 kV-Röntgenstrahlen

Dosisleistung: 125 rad/sec

Temperatur : 25°C ±1

Extinktionsmessung bei 264 nm

pH zu Beginn: 5,5      pH nach 180 krad: 4,3

Abbildung 17 zeigt die maximale T-Antstehung in Abhängigkeit von der TT-Konzentration der bestrahlten Lösung, bei der Einwirkung von 130 kV-Röntgenstrahlen. Die Maxima verschieben sich mit zunehmender TT-Konzentration zu höheren Dosiswerten.

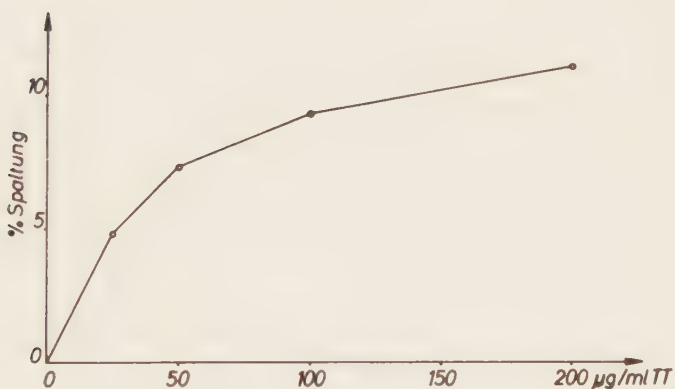


Abb. 17: Maximale Bildung von monomerem Thymin bei unterschiedlichen Anfangskonzentrationen an TT, unter Einwirkung von 130 kV-Röntgenstrahlen

#### 4.3.2 Spaltung von dimerem Thymin in monomeres durch Röntgenstrahlen, in Abhängigkeit von Dosis und Temperatur

10 ml-Proben einer wässrigen, ungepufferten 100 µg/ml TT-Lösung werden bei  $3^{\circ}\text{C} \pm 1$ ,  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$  und  $36^{\circ}\text{C} \pm 1$  mit unterschiedlichen Dosen von 130 kV-Röntgenstrahlen bestrahlt.

Nach der Bestrahlung wird die Extinktion bei 264 nm gemessen und im Diagramm gegen die Dosis aufgetragen (Abb. 18). Mit abnehmender Temperatur nimmt auch die Steigung im Anfangsteil der Kurven ab, das Maximum wird kleiner und verschiebt sich zu höheren Dosiswerten. So liegt bei einer Bestrahlungstemperatur von  $36^{\circ}\text{C}$  das Maximum bei 115 krad, bei  $3^{\circ}\text{C}$  dagegen erst bei 150 krad. Die maximale T-Bildung sinkt von 9,95 % bei  $36^{\circ}\text{C}$  auf 8,5 % bei  $3^{\circ}\text{C}$  ab.

Der flachere Kurvenanstieg mit abnehmender Temperatur besagt, daß auch die Spaltung des TT in T abnimmt. Das Gleichgewicht zwischen Thyminbildung und Zerstörung wird erst bei höheren Dosen erreicht.

#### 4.3.3 Spaltung von dimerem Thymin in monomeres durch Röntgenstrahlen, in Abhängigkeit von der Dosisleistung

Proben einer 100 µg/ml TT-Lösung werden mit 130 kV-Röntgenstrahlen bei Dosisleistungen von 125 rad/sec und 11 rad/sec bestrahlt. Die geringere Dosisleistung wird durch Vorschalten eines Al-Filters und durch Vergrößerung des Abstandes zwischen Probe und Strahlenquelle erreicht (s. Material und Methoden (3.2)).

Abbildung 19 zeigt den Kurvenverlauf. Bis zu einer Dosis von 40 krad stimmen beide Kurven überein, danach steigt die Extinktion bei der geringeren Dosisleistung steiler

an als bei höherer Dosisleistung. Das Maximum der Bildung von monomerem Thymin wird erst bei höheren Dosen erreicht.

Der maximale Gehalt der Lösung an T beträgt bei geringer Dosisleistung 12 %, bei hoher Dosisleistung 9,4 %.

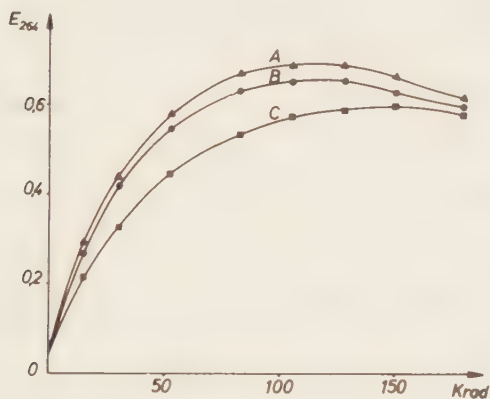


Abb. 18: Spaltung von TT, gemessen als Extinktion von T, in Abhängigkeit von Dosis und Temperatur

Kurve A: Temperatur =  $36^{\circ}\text{C} \pm 1$

" B: " =  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$

" C: " =  $3^{\circ}\text{C} \pm 1$

Anfangskonzentration: 100  $\mu\text{g/ml}$  TT

Strahlung : 130 kV-Röntgenstrahlen

Dosisleistung : 125 rad/sec

Extinktionsmessung bei 264 nm

pH-Wert bei Bestrahlungsbeginn: 5,5

pH-Wert nach Bestrahlung mit 180 krad: 4,5

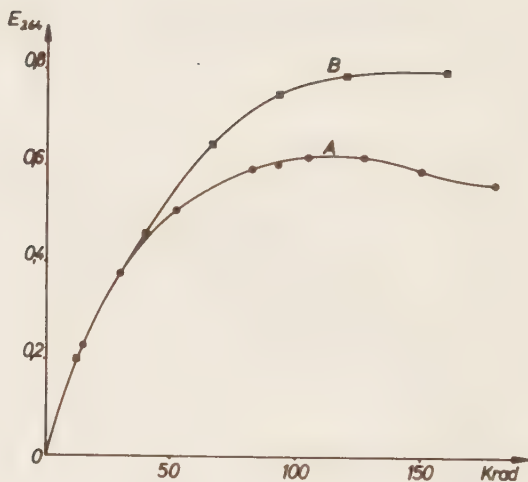


Abb. 19: Spaltung von TT, gemessen als Extinktion von T, in Abhängigkeit von der Dosisleistung

Kurve A: Dosisleistung = 125 rad/sec

ohne Filter

" B: " = 11 rad/sec

mit 2 mm Al-Filter

Anfangskonzentration: 100  $\mu\text{g/ml}$  TT

Strahlung : 130 kV-Röntgenstrahlen

Extinktionsmessung bei 264 nm

pH-Wert bei Bestrahlungsbeginn: 5,5

pH-Wert nach Bestrahlung mit 180 krad: 4,5

Temperatur:  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$

#### 4.3.4 Beeinflussung der Spaltung von dimerem Thymin in monomeres bei Röntgenbestrahlung, durch Zugabe von Cystein

Wässrige 100  $\mu\text{g/ml}$  TT-Lösungen mit Zusatz von 100 bzw. 200  $\mu\text{g/ml}$  Cystein werden mit unterschiedlichen Dosen von 130 kV-Röntgenstrahlen bestrahlt.<sup>+)</sup>

Anschließend wird die Extinktionsänderung (Ordinate) bei 264 nm gemessen und gegen die Dosis (Abszisse) aufgetragen. Abbildung 20 zeigt die Änderungen im Kurvenverlauf bei Zugabe von Cystein.

Bei reiner 100  $\mu\text{g/ml}$  TT-Lösung liegt das Extinktionsmaximum bei 115 krad, bei Zusatz von 100  $\mu\text{g/ml}$  Cystein bei 120 krad und bei 200  $\mu\text{g/ml}$  Cystein-Zusatz bei 160 krad. Bei Cystein-Zusatz steigt die Extinktion wesentlich langsamer an, der Kurvenverlauf wird flacher.

Cystein übt eine Strahlenschutzwirkung aus. Die Bildung des monomeren Thymins wird verzögert, höhere Strahledosen werden notwendig, um die gleiche Extinktionsänderung wie ohne Cystein-Zusatz zu erhalten.

Auch die Spaltung des monomeren Thymins wird verzögert, erkennbar daran, daß mit steigender Cysteinkonzentration das Extinktionsmaximum höher liegt.

Die maximale T-Bildung beträgt bei der 100  $\mu\text{g/ml}$  TT-Lösung ohne Cystein-Zusatz 9,4 %, bei Zusatz von 100  $\mu\text{g/ml}$  Cystein 12,2 %, bei 200  $\mu\text{g/ml}$  Cystein-Zusatz 14,1 %. Eine Zusammenstellung der Werte ist in Tabelle 2 wiedergegeben.

<sup>+)</sup>

An dieser Stelle danke ich Frau Aichele, Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie, für die Hilfe bei der Herstellung und Bestrahlung der Cystein-TT-Lösungsgemische.

| Cystein-Zusatz<br>(ug/ml) | max.Extinkt.<br>bei 264 nm | max.T-Bildg.<br>(%) | erforderliche<br>130kV-Röntgen-<br>dosis (krad) |
|---------------------------|----------------------------|---------------------|-------------------------------------------------|
| 0                         | 0,61                       | 9,4                 | 115                                             |
| 100                       | 0,80                       | 12,2                | 270                                             |
| 200                       | 0,92                       | 14,1                | 400                                             |

Tabelle 2: Die Abhängigkeit der maximalen T-Bildung vom Cysteingehalt der bestrahlten Lösung

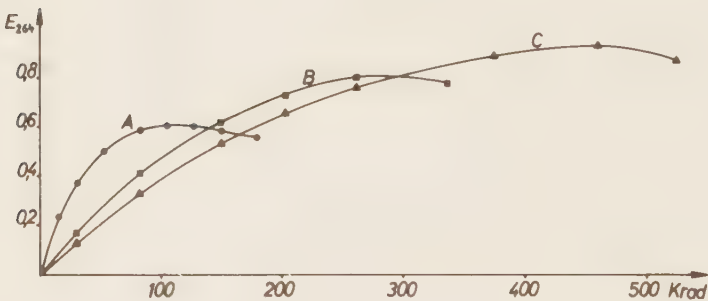


Abb. 20: Spaltung von TT in monomeres durch Röntgenstrahlen bei Zugabe unterschiedlicher Mengen von Cystein

Kurve A: 100 µg/ml TT ohne Cysteinzusatz  
 " B: 100 µg/ml TT + 100 µg/ml Cystein  
 " C: 100 µg/ml TT + 200 µg/ml Cystein

Strahlung : 130 kV-Röntgenstrahlen  
 Temperatur :  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$   
 Extinktionsmessung bei 264 nm

#### 4.4 Spaltung von dimerem Thymin in monomeres durch schnelle Elektronen und Röntgenstrahlen unterschiedlicher Energie

Proben einer wässrigen 100 µg/ml TT-Lösung werden mit gleichen Dosen schneller Elektronen und 25, 35, 130 und 250 kV-Röntgenstrahlen bestrahlt. Anschließend wird die Extinktionsänderung der Proben bei 264 nm spektralphotometrisch bestimmt und im Diagramm gegen die Dosis aufgetragen (Abb. 21).

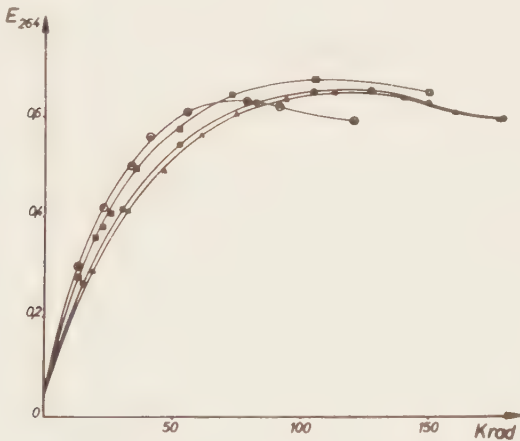


Abb. 21: Spaltung von TT in monomeres durch unterschiedliche Strahlenqualitäten, gemessen als Extinktionsänderung

Kurve ○—○ : 34 MeV-Elektronen  
" ■—■ : 250 kV-Röntgenstrahlen  
" ●—● : 130 kV-Röntgenstrahlen  
" ▲—▲ : 35 kV-Röntgenstrahlen

Anfangskonzentration : 100 µg/ml TT

Temperatur : 25°C ± 1

Extinktionsmessung bei 264 nm

pH-Wert bei Bestrahlungsbeginn : 5,5

Der Versuch mit 25, 35 und 130 kV-Röntgenstrahlen wird insgesamt 6 mal, der mit 250 kV-Röntgenstrahlen 2 mal wiederholt.

Da sich die Extinktionen bei der Bestrahlung des TT mit 25 und 35 kV-Röntgenstrahlen nicht signifikant unterscheiden, sind in Abbildung 21 nur die Extinktionsänderungen bei Einwirkung von 35 kV-Röntgenstrahlen eingezeichnet.

Es entstehen vier Kurven mit unterschiedlichem Verlauf. Sie verlaufen nicht durch den Nullpunkt, da die Extinktion gegen das Lösungsmittel Aqua tridest gemessen wird.

Aus technischen Gründen kann die 34 MeV-Elektronenkurve nur bis zu einer Dosis von 120 krad verfolgt werden, da bei der geringen Dosisleistung lange Bestrahlungszeiten nötig sind, und das Betatron nur für begrenzte Zeit zur Verfügung steht.

Mit zunehmender Energie der Strahlung nimmt die Steigung am Kurvenbeginn zu. Je energiereicher die Strahlung ist, desto mehr T wird bei gleicher eingestrahelter Dosis erzeugt. Das Maximum wird bei kleineren Dosen erreicht. Es liegt für 34 MeV-Elektronen bei 75 krad, für 250 kV-Röntgenstrahlen bei 105 krad, für 130 kV-Röntgenstrahlen bei 115 krad und für 35 kV-Röntgenstrahlen bei 120 krad. Die maximale Bildung von T differiert bei den vier Strahlenqualitäten um maximal 0,7 % und liegt im Durchschnitt bei 9,4 %.

| Energie der Strahlung | Dosis im Maximum (krad) | $E_{T, \max}$ bei 264nm | Dosisleistung (krad/min) | maximale T-Bildung (%) |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|
| 34 MeV $e^-$          | 75                      | 0,625                   | 0,60                     | 9,1                    |
| 250kV Rö.             | 105                     | 0,630                   | 1,3                      | 9,8                    |
| 130kV "               | 115                     | 0,615                   | 7,49                     | 9,4                    |
| 35kV "                | 120                     | 0,630                   | 4,69                     | 9,4                    |

Tabelle 3: Maximale Spaltung von TT in T durch schnelle Elektronen und Röntgenstrahlen unterschiedlicher Energie. (Meßwerte aus Abbildung 21)

#### 4.4.1 Spaltung von dimerem Thymin in monomeres durch schnelle Elektronen und Röntgenstrahlen gleicher Dosisleistung

Proben wässriger 100 µg/ml TT-Lösung werden mit 34 MeV-Elektronen und 130 kV-Röntgenstrahlen bestrahlt. Die Dosisleistung bei der Röntgenstrahlung wird durch entsprechenden Versuchsaufbau (s. Material und Methoden) auf einen Wert von 11 rad/sec eingestellt, analog der Dosisleistung für schnelle Elektronen.

Gemessen wird die Extinktionsänderung nach der Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen.

Abbildung 22 zeigt den Verlauf der Extinktionsänderungen (Ordinate) in Abhängigkeit von der Dosis (Abszisse) bei gleicher Dosisleistung der Elektronen- und Röntgenbestrahlung.

Die Elektronen-Kurve (A) zeigt im Anfangsteil einen steileren Verlauf als die Röntgen-Kurve (B).

Der steilere Kurvenverlauf, d.h. die höhere Extinktion bedeutet eine stärkere T-Bildung durch 34 MeV-Elektronen als durch die gleiche Dosis Röntgenstrahlen.

Das Extinktionsmaximum liegt bei Elektroneneinwirkung bei  $E_{264} = 0,595$ , nach Einwirkung von Röntgenstrahlen bei  $E_{264} = 0,790$ .

Die Differenz von  $\Delta E_{264} = 0,195$  entspricht einem Unterschied der T-Bildung im Maximum von 32,8 %.

Durch 130 kV-Röntgenstrahlen werden bei einer Dosisleistung von 11 rad/sec maximal 12 % monomeres Thymin gebildet, durch 34 MeV-Elektronen bei gleicher Dosisleistung 9,1 %.

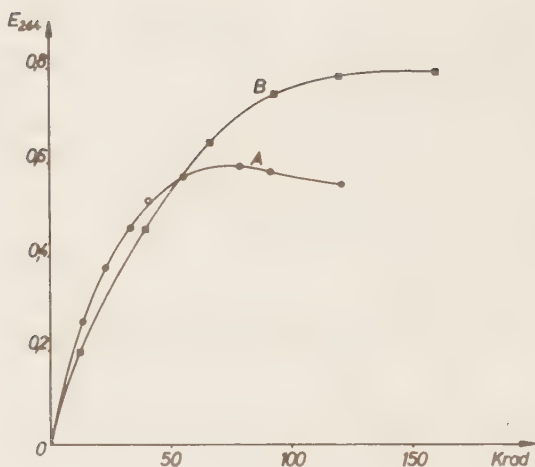


Abb. 22: Spaltung von dimerem Thymin in monomeres durch 34 MeV-Elektronen und 130 kV-Röntgenstrahlen gleicher Dosisleistung

Kurve A: 34 MeV-Elektronen

" B: 130 kV-Röntgenstrahlen

Anfangskonzentration : 100 µg/ml TT

Temperatur : 25°C ± 1

Dosisleistung : 11 rad/sec

Extinktionsmessung : bei 264 nm

pH-Wert bei Bestrahlungsbeginn : 5,5

#### 4.5 Ermittlung der Streubreiten bei der Spaltung von TT in T durch konstante Dosen unterschiedlicher Strahlenqualitäten an Hand von 30 Einzelmessungen

Bei einer Dosis von 23 krad werden jeweils zehn Einzelmessungen mit 250, 130 und 35 kV-Röntgenstrahlen vorgenommen. Auf die zehn Einzelmessungen bei der 34 MeV-Elektronenkurve muß verzichtet werden, da uns das Gerät nur begrenzte Zeit zur Verfügung steht.

Abbildung 23 zeigt in einem Ausschnitt aus Abbildung 21 die Streubreite der Einzelmessungen.

Die Streubreiten überschneiden sich nicht.

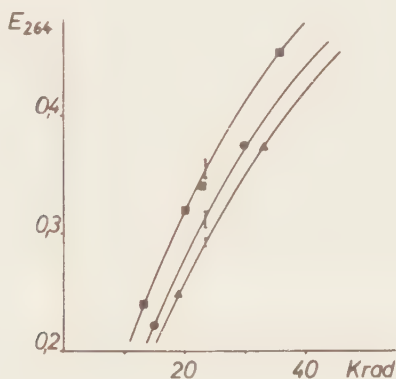


Abb. 23: Graphische Darstellung der drei Streubreiten aus jeweils 10 Einzelmessungen bei konstanter Dosis von 23,5 krad

Kurve ■—■ : 250 kV-Röntgenstrahlen  
" ●—● : 130 kV-Röntgenstrahlen  
" ▲—▲ : 35 kV-Röntgenstrahlen

#### 4.5.1 Statistische Prüfung der TT-Spaltung in monomeres Thymin durch unterschiedliche Strahlenenergie

Um zu prüfen, ob der im Versuch ermittelten unterschiedlichen TT-Spaltung in monomeres Thymin bei unterschiedlichen Strahlenqualitäten eine statistische Signifikanz zugesprochen werden kann, wird der H-Test zum Vergleich mehrerer unabhängiger Stichproben von Kruskal und Wallis (47) angewendet.

Hierbei werden die ermittelten Stichproben k (Extinktion einer 100 µg/ml TT-Lösung bei 264 nm nach Bestrahlung mit gleichen Dosen (23,5 krad) von 35, 130 und 250 kV-Röntgenstrahlen) zu einem Kollektiv mit dem Umfang  $n = 30$  vereinigt. Allen Meßwerten werden Ränge R von 1 bis n zugeteilt, wobei dem höchsten Meßwert der Rang 30, dem zweithöchsten Meßwert der Rang 29 usw. zugeordnet wird.

Als Meßwerte werden die in Tabelle 4 angegebenen Werte von dreißig Einzelmessungen verwendet.

Die Beurteilung der Signifikanz erfolgt nach der von Kruskal und Wallis 1952 definierten Prüfgröße  $\hat{H}$ .

$\hat{H}$  wird mit tabellierten Werten der  $\chi^2$  - Verteilung verglichen.(48)

$$\hat{H} = \left[ \frac{12}{n(n+1)} \right] \cdot \left[ \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} \right] - 3(n+1)$$

Die Zahlen 12 und 3 stellen mathematische Konstanten, n die Anzahl der Meßwerte,  $n_i$  die Anzahl der Meßwerte pro Stichprobe, k die Anzahl der Stichproben und  $R_i$  die Summe der Ränge dar.

Extinction der Laserstrahlen bei 264nm nach Applikation von

| 35 kV-Rö.     | Rang  | 130 kV-Rö. | Rang              | 250 kV-Rö. | Rang |
|---------------|-------|------------|-------------------|------------|------|
| 0,331         | 1     | 0,347      | 11                | 0,389      | 21   |
| 0,332         | 2     | 0,350      | 12                | 0,391      | 22   |
| 0,332         | 3     | 0,350      | 13                | 0,392      | 23   |
| 0,333         | 4     | 0,356      | 14                | 0,394      | 24   |
| 0,334         | 5     | 0,357      | 15                | 0,395      | 25   |
| 0,335         | 6     | 0,357      | 16                | 0,397      | 26   |
| 0,336         | 7     | 0,359      | 17                | 0,397      | 27   |
| 0,337         | 8     | 0,360      | 18                | 0,400      | 28   |
| 0,338         | 9     | 0,360      | 19                | 0,405      | 29   |
| 0,338         | 10    | 0,360      | 20                | 0,405      | 30   |
| $R_i$         | 15,   | 155,0      |                   | 255,0      |      |
| $R_i^2$       | 225,0 | 24025,0    |                   | 65025,0    |      |
| $n_i$         | 10    | 10         |                   | 10         |      |
| $R_i^2 / n_i$ | 22,5  | 2402,5     | + 6502,5 = 9207,5 |            |      |

Tabelle 4: Auswertung der dreißig Einzelmessungen  
für den H-Test nach Kruskal und Wallis (47)

$$\hat{H} = \frac{12}{30(30+1)} \cdot 9207,5 - 3(30+1);$$

$$\hat{H} = 26;$$

In der Tabelle für die  $\chi^2$  - Verteilung ist bei zwei Freiheitsgraden der letzte Wert für eine Wahrscheinlichkeit von 0,001 angegeben. Der Wert beträgt 13,815.

Da  $\hat{H}$  größer als 13,815 ist, besteht auf dem 0,1 % - Niveau ein echter Unterschied zwischen den durchgeführten Stichproben. Die Mittelwerte der Dimerenspaltung in monomeres Thymin durch Strahlen unterschiedlicher Energie unterscheiden sich mit 99,9 %iger Sicherheit.

## 5 Diskussion der eigenen Versuchsergebnisse

Bei der Bildung von monomerem Thymin aus TT durch schnelle Elektronen und Röntgenstrahlen unterschiedlicher Energie ergeben sich im Versuch deutliche Unterschiede in der Wirkung der 35, 130 und 250 kV-Röntgenstrahlen und den 34 MeV-Elektronenstrahlen.

Entgegen der Vermutung, daß die Wirkung der Röntgenstrahlen auf die Spaltung des TT in T größer sei als die der schnellen Elektronen, vergleichbar mit der relativen biologischen Wirksamkeit, zeigt sich im in vitro-Versuch eine größere Wirkung der 34 MeV-Elektronen.

Die Steigung im Anfangsteil der Kurve (s. Abb. 21) ist größer. Das bedeutet eine größere T-Bildung.

Das Maximum wird bei einer geringeren Dosis erreicht, d.h. das Gleichgewicht zwischen Neubildung und Zerstörung des monomeren Thymins liegt bei einer geringeren Dosis als bei der Röntgenstrahlung.

Aber auch die Wirkung der unterschiedlich energiereichen Röntgenstrahlen zeigt einen signifikanten Unterschied bei der Spaltung des TT in monomeres.

Die experimentell ermittelten Ergebnisse werden unter folgenden Gesichtspunkten diskutiert:

- 1) Geben sie einen signifikanten Wirkungsunterschied der unterschiedlichen Strahlenqualitäten wieder, oder kann der Unterschied durch Fehler in der Methodik bedingt sein? (s.5.1)
- 2) Welche Faktoren kommen für die unterschiedliche Strahlenwirkung in Frage? (s. 5.2 - 5.5)
- 3) Läßt sich ein Zusammenhang zwischen der Strahlenwirkung auf TT in vitro und der relativen biologischen Wirksamkeit herstellen? (s. 5.6)

## 5.1 Diskussion der Methodik

### 5.1.1 Spektralphotometrische Auswertung

Zur Messung der strahlenchemischen Veränderungen wird die spektralphotometrische Auswertung herangezogen. Im Gegensatz zur Chromatographie hat diese den Vorteil größerer Meßgenauigkeit, soweit es sich um Gemische zweier Reinsubstanzen handelt.

Daß die mit unseren Strahlendosen bestrahlte TT-Lösung zum überwiegenden Teil aus nur zwei Substanzen, nämlich TT und T besteht, darf auf Grund der von Lochmann (32, 33) und von Hartmann et al. (34) angestellten Untersuchungen angenommen werden.

Wie schon in der Einleitung (S. 19) erwähnt, findet Lochmann (33) weniger als 1 % Harnstoff und weniger als 1 % einer nicht identifizierten Substanz bei der Bestrahlung einer 200 µg/ml TT-Lösung mit 200 krad einer 50 kV-Röntgenstrahlung. Bei einer Dosis von 600 krad sind es 4 % Harnstoff und 3 % einer nicht identifizierten Verbindung.

Hartmann et al. (34, 41) stellen bei der Bestrahlung einer wässrigen 128 µg/ml TT-2-<sup>14</sup>C-Lösung mit 76 krad 34 MeV-Elektronen bei der radiopapierchromatographischen Auswertung nur ca. 1 % Harnstoff fest.

Nach der Bestrahlung einer wässrigen 150 µg/ml TT-Lösung mit 200 krad 34 MeV-Elektronen finden sie bei der papierchromatographischen und spektralphotometrischen Auswertung, daß 40 % des TT in monomeres Thymin gespalten, aber nur 2 % der Radioaktivität in Form anderer Bestrahlungsprodukte vorliegen.

Da bei den eigenen Versuchen mit einer maximalen Dosis von 180 krad bestrahlt wird (34 MeV-Elektronen nur bis zu einer Dosis von 120 krad), darf angenommen werden, daß der Anteil des zerstörten monomeren Thymins gering ist.

Die Messung der Extinktion des monomeren Thymins als Kriterium der Strahlenwirkung auf wässrige TT-Lösung unter Vernachlässigung des zerstörten T-Anteils darf deshalb zumindest im Anfangsteil der Kurven vorgenommen werden.

Die Extinktion wird bei einer Wellenlänge von 264 nm gemessen. Monomeres Thymin hat bei dieser Wellenlänge seine maximale Extinktion (s. Abb. 12), während die Extinktion des TT bei 264 nm sehr gering ist ( $E_{264}$  einer 100  $\mu\text{g/ml}$  TT-Lösung = 0,004).

Im Verlauf der Untersuchungen wird deutlich, daß das Ausmaß der relativen Zerstörung des Pyrimidinringes bei geringen Substanzkonzentrationen an Bedeutung gewinnt und bei höheren Konzentrationen keine wesentliche Rolle spielt.

#### 5.1.2 Mögliche Meßungenauigkeiten durch Verunreinigungen

Da die spektralphotometrische Messung extrem anfällig gegen Verunreinigungen der Küvetten und der Lösung ist, wird bei den Versuchen auf größte Sauberkeit der verwendeten Küvetten, Gefäße und Pipetten geachtet.

Die Küvetten werden mit Chrom-Schwefelsäure gereinigt, Kolben, Pipetten und Rührstäbchen mit Aqua tridest ausgekocht und gespült.

Die Bestrahlung der Proben erfolgt in Plexiglasschalen. Um zu prüfen, ob durch die Bestrahlung Stoffe aus dem Kunststoff freigesetzt werden, die die Extinktion beeinflussen, wird Aqua tridest sowohl in Plexiglasschalen, als auch in Glasschalen eine Stunde mit 130 kV-Röntgenstrahlen bestrahlt. Die Dosis beträgt 450 krad.

Es zeigt sich keine Extinktionsänderung bei 264 nm.

Um zu prüfen, ob auch nach längerer Einwirkungszeit aus den Plastikscheiden keine Stoffe in Lösung gehen, werden Proben von Aqua tridest bei Zimmertemperatur stehengelassen

und die Extinktionen nach 1 Stunde und nach 18 Stunden gemessen. Es zeigt sich kein Extinktionsunterschied.

Um zu prüfen, ob das Rühren mit dem magnetischen Rührstäbchen durch eventuellen Abrieb von Gefäß und Rührer eine Extinktionsänderung bewirkt, wird TT-Lösung unter Versuchsbedingungen 60 min lang gerührt.

Es zeigt sich auch hier keine Extinktionsänderung.

Mit diesen Untersuchungen werden die Ergebnisse von Law (45) und anderer von ihm zitierter Autoren, die den Einfluß verschiedener Plastikgefäße bei der Eisensulfat-Dosimetrie untersuchen, bestätigt.

Auch sie stellen keinen Einfluß der Plastikgefäße auf die Lösung fest.

Jede Probe wird in einer neuen Schale mit frischem Rührstäbchen bestrahlt. Eventuelle Verunreinigungen durch Rührer und Gefäß bleiben so auf eine Probe beschränkt.

Zur Extinktionsmessung werden vier Quarzküvetten verwendet. Zu Beginn jeder Meßreihe wird die Nullextinktion neu festgelegt. Die Proben einer Meßreihe werden anschließend in diesen Küvetten gemessen. Der gesamte Kurvenverlauf könnte durch eventuelle Verschmutzung einer Küvette oder Probe nicht beeinflußt werden. Nur einzelne Meßpunkte können herausfallen.

Die TT-Lösung wird für jede Versuchsreihe aus der kristallinen Trockensubstanz unmittelbar vorher frisch angesetzt. Die Reproduzierbarkeit einzelner Meßpunkte wird durch Wiederholung der Messung mit neuem Lösungsansatz bestätigt.

Verunreinigungen als Ursache des signifikanten Wirkungsunterschiedes verschiedener Strahlenqualitäten können auf Grund der angestellten Überlegungen und Untersuchungen mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

### 5.1.3 Dosimetrie und verwendete G-Werte als mögliche Ursachen für die unterschiedliche Strahlenwirkung

Zur Dosismessung wird die Methode nach Fricke, d.h. die Erzeugung von  $\text{Fe}^{+++}$ - aus  $\text{Fe}^{++}$ - Ionen verwendet. Sie kann unter den gleichen Bedingungen wie die Bestrahlung der TT-Lösung vorgenommen werden.

Dosimetrie wie auch TT-Bestrahlung finden in wässriger Lösung, in den gleichen Gefäßen, bei gleicher Temperatur, Rührgeschwindigkeit, Schichtdicke und Abstand von der Strahlenquelle statt.

In vergleichenden Untersuchungen von Bewley (46) wird die gute Reproduzierbarkeit der Fricke-Dosimetrie gegenüber der Film-Dosimetrie und der Dosismessung mit der Ionisationskammer hervorgehoben.

Die Fricke-Dosimetrie zeigt in einem weiten Bereich keine Abhängigkeit von der Dosisleistung, der Eisen(II)-Ionen-Konzentration sowie von der  $\text{H}^+$ -Ionen-Konzentration (46).

Es kann also für die vergleichende Untersuchung der Strahlenwirkung von Elektronen- und Röntgenstrahlen das gleiche Dosismeßverfahren angewendet werden.

Unsicherheit entsteht bei der Frage, welcher G-Wert für die Berechnung der Dosis bei den unterschiedlichen Strahlen zu verwenden ist, da die in der Literatur angegebenen Werte differieren.

Für die 34 MeV-Elektronen-Dosimetrie wird  $G = 14,5$  eingesetzt (G-Wert der International Atomic Energy Agency für 35 MeV-Elektronen).

Für 35kV-, 130 kV- und 250 kV-Röntgenstrahlen werden die G-Werte  $G_{35} = 13,8$ ,  $G_{130} = 14,4$  und  $G_{250} = 15,1$  eingesetzt.<sup>+)</sup>

---

<sup>+)</sup> Die G-Werte wurden mir freundlicherweise von Herrn W.Plümcke, Diplom-Physiker an der Abteilung für Strahlenphysik im städtischen Rudolf Virchow-Krankenhaus, 1 Berlin 65, zur Verfügung gestellt. Sie stimmen mit den neuesten Vorschlägen des Fachnormausschusses für Radiologie überein.

Um zu prüfen, wie stark sich eine Änderung des G-Wertes auf die errechnete Dosis und damit auf die Abhängigkeit der Spaltung von TT von der eingestrahlten Dosis auswirkt, werden die G-Werte verändert.

Es werden durch Änderung der G-Werte der 250 kV- und der 35 kV-Röntgenstrahlen Änderungen der Dosisleistung konstruiert, die zu einem gleichen Effekt, d.h. zu gleicher Extinktion ( $E = 0,4$ ) bei 264 nm durch die Bildung von monomerem Thymin führen, wie die 130 kV-Röntgenstrahlen. Der G-Wert der 250 kV-Röntgenstrahlen müßte statt 15,1 dann 12,76 betragen (Differenz: -2,34).

Der G-Wert der 35 kV-Röntgenstrahlen müßte statt 13,8 dann 15,5 (Differenz: +1,7) betragen.

In Abbildung 24 sind die verwendeten G-Werte (A) und die errechneten G-Werte (B), die notwendig wären, um die drei Kurven bei  $E = 0,4$  zur Deckung zu bringen, graphisch dargestellt.

Aus der Darstellung ersieht man, daß eine Schwankung der G-Werte als Ursache für die unterschiedliche Strahlenwirkung nicht wahrscheinlich ist.

Während die zur Dosisberechnung verwendeten G-Werte ansteigen, bilden die errechneten G-Werte eine abfallende Gerade.

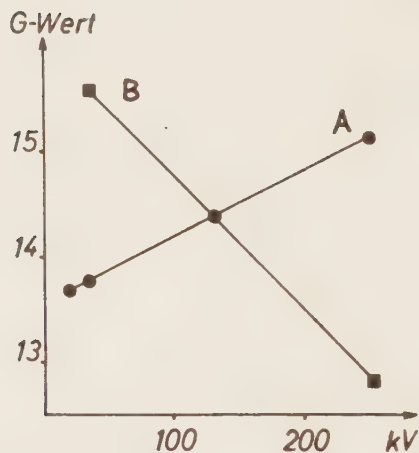


Abb. 24: Graphische Darstellung der G-Werte in Abhängigkeit von der Strahlendosis

Kurve A: Zur Dosisberechnung verwendete G-Werte

" B: errechnete G-Werte, um die 35 kV- und die 250 kV-Kurve mit der 130 kV-Kurve bei  $E = 0,4$  zur Deckung zu bringen

5.2 Ursachen, die bei gleichen Versuchsbedingungen für die unterschiedliche Wirkung von Röntgenstrahlen und schnellen Elektronen auf die Spaltung von TT in monomeres in Frage kommen

5.2.1 Unterschiedliche Energie der ionisierenden Strahlen als Ursache für die unterschiedliche Spaltung von TT in monomeres

Abbildung 21 zeigt die Abhängigkeit der TT-Spaltung in monomeres von der Energie der ionisierenden Strahlung. Mit zunehmender Energie der Strahlung nimmt die Steigung im Anfangsteil der Kurven zu. Bei gleicher Dosis ist mit energiereicherer Strahlung ein höheres Maß an T-Bildung zu erzielen. Das Extinktionsmaximum wird bei geringerer Dosis erreicht. Die Spaltung des monomeren Thymins erfolgt also auch früher.

Die Aufspaltung des Cyclobutanringes des dimeren Thymins und die Zerstörung des monomeren Thymins, d.h. die Aufspaltung des Pyrimidinringes, sind zwei Prozesse, die eine Energiezufuhr erfordern.

Zur Spaltung eines Cyclobutanringes werden etwa 2 eV benötigt (40). Die Bindungsenergie für homöopolare Bindungen, wie sie im Pyrimidinring vorliegen, beträgt 1,5 - 7,5 eV. Die Spaltung des relativ stabilen Pyrimidinringes erfordert im Durchschnitt mehr Energie als die Spaltung des Cyclobutanringes. Dies ist wahrscheinlich die Ursache dafür, daß bei der Bestrahlung von TT erst das dimere Thymin gespalten wird, bevor es zur Zerstörung des monomeren Thymins kommt.

Durch die hohe Energie der Elektronenstrahlung wird auch der Pyrimidinring leichter gespalten, so daß hierbei das Extinktionsmaximum bei geringerer Dosis erreicht wird.

Der steilere Kurvenanstieg der Elektronenkurve kann durch die leichte Spaltbarkeit des TT durch schnelle Elektronen, die bereits von Beukers und Berends auf Grund massenspektrographischer Untersuchungsergebnisse (4) vermutet worden war und später von Hartmann et al. (34, 36, 37) nachgewiesen wird, verursacht sein.

Ein sehr hoher G-Wert ( $G = 1040$ ), d.h. eine sehr hohe TT-Spaltung läßt sich bei der Bestrahlung von kristallinem Thymin erzielen (39).

Weinblum findet bei der Bestrahlung von dimerem Dimethylthymin in der cis-syn-Form im Kristall einen G-Wert von 6300. Dabei soll es zu einer Kettenreaktion kommen, die den extrem hohen G-Wert erklärt (40).

Nach neuesten Elektronenspin-Resonanz-Untersuchungen von Neta (51) findet die Spaltung des Pyrimidinringes des Thymins bei Bestrahlung mit schnellen Elektronen durch Anlagerung einer OH-Gruppe an das  $C_6$ -Atom statt.

Die unterschiedliche Strahlenwirkung ist möglicherweise auch in der unterschiedlichen Energieübertragung der ionisierenden Strahlen zu sehen.

Die Energieübertragung von Röntgen- und Gammastrahlen auf die bestrahlte Substanz erfolgt durch Wechselwirkung mit den Atomelektronen. Der Hauptteil der Energie wird in Anregung der Elektronen und in Ionisationen umgesetzt (Prozesse a - c).

Vier Prozesse sind von Bedeutung (42).

- a) Anregung
- b) Photoelektrischer Effekt
- c) Comptoneffekt
- d) Paarbildung

Die Häufigkeit der Prozesse ist von der eingestrahnten Energie und der Ordnungszahl der bestrahlten Materie abhängig. Bei 10 kV beträgt der Photoeffekt mehr als 99 %, bei

200 kV tritt zu über 99 % der Comptoneffekt auf, während bei 20 MeV zu 49 % Paarerzeugung erfolgt (42).

| Energie der Strahlung | Photoeffekt | Comptoneffekt | Paarerzeugung |
|-----------------------|-------------|---------------|---------------|
| 10 kV                 | > 99 %      |               |               |
| 100 kV                | < 1 %       | > 99 %        |               |
| 1 MeV                 | < 1 %       | ~ 98 %        | ~ 1 %         |
| 20 MeV                | -           | ~ 50 %        | ~ 49 %        |

Tabelle 5: Verteilung der energieübertragenden Prozesse bei der Absorption von Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung im Gewebe nach Fritz-Higgli (42)

Die Wirkung der Röntgen- und Gammastrahlen beruht dabei nicht auf ihren Primärwechselwirkungen, sondern auf der Wirksamkeit der Sekundärstrahlung, also hauptsächlich der  $\beta$ -Strahlung.

Schnelle Elektronen aus einem Teilchenbeschleuniger (Betatron), die mit hoher Energie in Materie eingestrahlt werden, können durch eine Stoß-Wechselwirkung und eine Streif-Wechselwirkung Sekundärelektronen aus einem Atom oder Molekül freisetzen (14).

Die Primärionisation beträgt dabei nur ein Bruchteil der durch Sekundärelektronen hervorgerufenen Ionisationen.

Die Elektronen sind direkt ionisierende Teilchen. Sie tragen eine elektrische Ladung und besitzen genügend kinetische Energie, um Ionisationen durch Stoß auszulösen.

Die Photonen der Röntgenstrahlung sind indirekt ionisierende Teilchen. Sie setzen direkt ionisierende Teilchen durch Wechselwirkung mit Materie frei.

In beiden Fällen entstehen sekundäre Elektronen.

35 kV- und 130 kV-Röntgenstrahlen und 34 MeV-Elektronen unterscheiden sich auch im linearen Energieverlust (LET), d.h. in der Zahl der Ionisationen pro Wegstrecke.

Die LET steigt mit dem Quadrat der Ladung sowie mit abnehmender Geschwindigkeit bzw. Energie des ionisierenden Teilchens an.

Infolge der hohen Energie der schnellen Elektronen ist die Energieübertragung pro Weglänge an die durchstrahlte Materie geringer, als für Röntgenstrahlen.

#### 5.2.2 Unterschiedliche Dosisleistung der ionisierenden Strahlen als Ursache für die unterschiedliche Spaltung von TT in monomeres

Die nachfolgenden Dosisleistungen wurden mit Hilfe der Fricke-Dosimetrie unter den Bedingungen des Versuchs ermittelt.

| Strahlung              | Dosisleistung<br>(krad/min) |
|------------------------|-----------------------------|
| 4 MeV-Elektronen       | 0,66                        |
| 250 kV-Röntgenstrahlen | 1,3                         |
| 130 kV- "              | 7,46                        |
| 35 kV- "               | 4,69                        |

Tabelle 6: Übersicht über die Dosisleistungen der ionisierenden Strahlen unterschiedlicher Energie

Als Folge der unterschiedlichen Dosisleistungen sind die Proben zur Erzielung gleicher Dosen für unterschiedlich lange Zeiten der Strahlung ausgesetzt.

Bei der Bestrahlung von Substanzen in wässriger Lösung beruht der Strahleneffekt hauptsächlich auf sekundärer

Strahlenwirkung. Der Unterschied in der Strahlenwirkung kann also bei gleicher Dosis auf die unterschiedlich lange Einwirkungszeit der in der Lösung entstehenden Radikale und Ionen zurückzuführen sein.

Nach einer von Collinson und Dainton 1952 aufgestellten Hypothese sind die Radikale bei geringen Dosisleistungen nicht gleichmäßig verteilt. Sie sind zufallsmäßig verteilt, und sie befinden sich voneinander unabhängig und weit getrennt in der Lösung.

Bei höheren Strahlenintensitäten liegen die Radikale nebeneinander, und die Verteilung ist homogen.

Im Gegensatz zur steigenden Strahlenenergie, die dem Anstieg der Extinktionen im Anfangsteil der Kurven entspricht, läßt sich in Abbildung 21 nur mit Ausnahme der 35 kV-Kurve eine Gesetzmäßigkeit für die Abhängigkeit von der Dosisleistung erkennen. Mit abnehmender Dosisleistung nimmt die Steigung im Anfangsteil der Kurven zu.

Die 35 kV-Kurve müßte im Fall einer ausschließlichen Dosisleistungsabhängigkeit zwischen der 250 kV- und der 130 kV-Kurve liegen.

Abbildung 22 zeigt die Spaltung von  $\text{H}_2\text{T}$  in T durch 34 MeV-Elektronen und 140 kV-Röntgenstrahlen bei gleicher Dosisleistung. Auch bei gleicher Dosisleistung, d.h. auch bei gleich langer Strahlenwirkung ist die Steigung im Anfangsteil der Elektronenkurve steiler als die der 130 kV-Röntgenstrahlen. Ein Unterschied in der Bildung von T nur auf Grund unterschiedlich langer Einwirkungszeiten zur Erzielung derselben Dosis der verschiedenen ionisierenden Strahlen scheidet damit als alleinige Ursache aus.

Als Ursache für den Wirkungsunterschied kommen auch hier die unterschiedliche Energieabgabe der Elektronen- und Röntgenstrahlen in Frage.

Während die Röntgenstrahlen ihre Energie zu 99 % über den

Comtoneffekt an die Materie abgeben, führt die Energie der schnellen Elektronen zu den vorher genannten Stoß- und Streifwechselwirkungen.

Die unterschiedliche TT-Spaltung beruht möglicherweise auf einem höheren Anteil der direkten Strahlenwirkung bei den schnellen Elektronen.

Auch an der Zerstörung des monomeren Thymins ist die direkte Strahlenwirkung der 34 MeV-Elektronen möglicherweise stärkerbeteiligt und führt eher zur Erreichung des Gleichgewichtes.

Eine weitere Möglichkeit der unterschiedlichen Wirkung ist die unterschiedliche Emission der Strahlung bei Röntgenröhre und Betatron. Im Gegensatz zur kontinuierlichen Röntgenstrahlung gibt das Betatron die Elektronen in Form einer gepulsten Strahlung ab.

Abbildung 19 zeigt die TT-Spaltung in monomeres bei gleicher Strahlenenergie und unterschiedlicher Dosisleistung am Beispiel der 130 kV-Röntgenstrahlung.

Für den unterschiedlichen Kurvenverlauf kommen folgende Ursachen in Frage:

a) Unterschiedliche Bestrahlungszeiten

Um dieselbe Dosis zu erhalten, müssen die Proben der Kurve B über 11 mal so lange bestrahlt werden wie die entsprechenden Proben der Kurve A.

b) Unterschiedliche Konzentration der sekundären Bestrahlungsprodukte

Bei geringerer Dosisleistung ist die Zahl der pro Zeiteinheit erzeugten Radikale und damit auch die Konzentration der sekundären Bestrahlungsprodukte geringer

### c) Unterschiedliches Spektrum der Röntgenstrahlung

Durch Vorschalten des Al-Filters zur Erhaltung einer niedrigeren Dosisleistung wird der energieärmere Teil der Strahlung absorbiert.

Da die energiearme Strahlung hauptsächlich den Photoeffekt auslöst, wird dieser bei der niedrigen Dosisleistung verringert, während der Comptoneffekt zunimmt.

### 5.3 Die Spaltung von TT in monomeres in Abhängigkeit von der Konzentration

Für Dosisleistung wird eine bestimmte Anzahl von Wasser-radikalen erzeugt, die ihrerseits auf eine bestimmte Zahl von gelösten Molekülen wirkt.

Mit steigender Konzentration des gelösten TT ist deshalb eine größere Dosis erforderlich, um eine maximale T-Bildung zu erzielen (s. Abb. 16).

Daß die T-Bildung nicht linear mit der Dosis ansteigt liegt u.a. daran, daß die Strahlenwirkung konzentrationsabhängig ist (14). Mit zunehmender Verdünnung beobachtet man eine Zunahme der Strahlenempfindlichkeit. Es tritt der sogenannte Verdünnungseffekt auf.

Mit zunehmender Konzentration gewinnt die direkte Strahlenabsorption an Bedeutung (14).

Bezo gen auf Abbildung 17 läßt sich der Kurvenverlauf so erklären:

Bei geringer TT-Konzentration liegt die maximale TT-Spaltung in monomeres auf Grund des Verdünnungseffektes relativ hoch. Mit steigender Konzentration wird der Verdünnungseffekt geringer. Der direkte Strahleneffekt nimmt zu, der Anteil des zerstörten T wird größer. Die gemessene Gesamttextinktion, d.h. die maximale T-Bildung,

steigt dadurch nicht linear mit der Dosis, sondern nähert sich, wie Abbildung 17 zeigt, asymptotisch einem Maximum.

#### 5.4 Die Abhängigkeit der TT-Spaltung in monomeres von der Temperatur

Wie aus Abbildung 18 hervorgeht, ist die Spaltung von TT in T temperaturabhängig. Mit sinkender Temperatur sinkt auch die Wirkung der ionisierenden Strahlung. Bei 37°C beträgt die maximale T-Bildung 9,95 %, bei 3°C nur noch 8,5 %.

Diese temperaturabhängige Strahlenempfindlichkeit findet sich bei sehr vielen Makromolekülen und biologischen Objekten und wird als Temperatur-Effekt bezeichnet (14).

Bei der T-Bildung kommt es auf die Temperatur während der Bestrahlung an. Nachträgliches Erhitzen der bestrahlten Lösung auf 100°C ändert die Extinktion nicht.

Auch die Extinktion von bestrahlter monomerer Thymidinlösung ändert sich durch nachträgliches Erhitzen auf 100°C nicht, wie dies in Abbildung 25 gezeigt wird.

Nach Dertinger und Jung (14) deutet der Temperatur-Effekt auf eine indirekte Strahlenwirkung hin. Die direkte Strahlenwirkung ist temperaturunabhängig.

Der temperaturabhängige Anteil der Strahlenschädigung geht vermutlich auf den Angriff diffusibler Radikale zurück.

Speziell bei der Spaltung von TT in T haben bereits Deering und Snipes (38) darauf hingewiesen, daß in reiner O<sub>2</sub>-Atmosphäre eine stärkere Aufspaltung des Pyrimidinringes erfolgt als in N<sub>2</sub>-Atmosphäre.

Da die Löslichkeit von O<sub>2</sub> mit steigender Temperatur abnimmt, könnte aus dem geringeren O<sub>2</sub>-Gehalt der bestrahl-

ten Lösung bei  $36^{\circ}\text{C}$  eine verringerte T-Zerstörung resultieren. Sie äußert sich in einem steileren Anstieg und in einer höheren maximalen Extinktion, im Vergleich zu den bei niedrigeren Temperaturen erhaltenen Werten.

In einem Liter luftgesättigtem Wasser sind bei  $3^{\circ}\text{C}$  9,39 ml, bei  $25^{\circ}\text{C}$  5,78 ml und bei  $36^{\circ}\text{C}$  4,80 ml Sauerstoff gelöst.

Bei höherer Temperatur nimmt auch die Beständigkeit der bei der Radiolyse des Wassers gebildeten Peroxide ab. Dadurch könnte eine geringere Zerstörung von T resultieren bzw. ein steilerer Extinktionsanstieg bei der Bestrahlung abgeleitet werden.

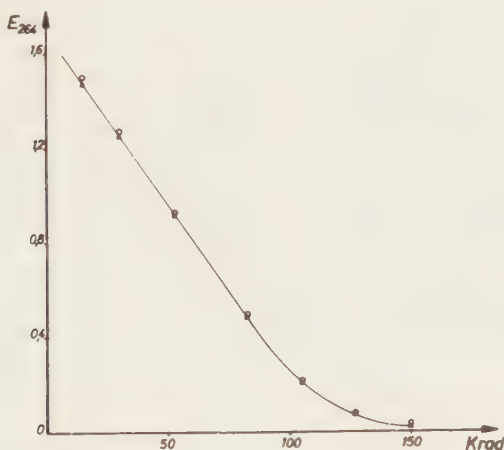


Abb. 25: Extinktion einer mit 130 kV-Röntgenstrahlen bestrahlten 25  $\mu\text{g/ml}$  Thymin-Lösung

▲ = T-Extinktion ohne Erhitzen

○ = T-Extinktion nach Erhitzen der bestrahlten Lösung auf  $100^{\circ}\text{C}$

## 5.5 Die Schutzwirkung von Cystein auf die Spaltung von TT in monomeres durch ionisierende Strahlen

Für den Schutz von Nucleinsäuren gegen Strahlenschäden spielen besonders SH-haltige Substanzen als Radikalfänger eine Rolle.

1949 entdecken Patt et al. (53) die schützende Wirkung von Cystein. Gray weist 1956 im Experiment nach, daß Cystein  $O_2$  bindet und aus Flüssigkeiten entfernt (54). Damit könnte die Schutzwirkung des Cysteins auf die TT-Spaltung teilweise mit der Verminderung des Sauerstoffeffektes erklärt werden. Die Bildung von Wasserstoffperoxyd, das mit Thymin zu Acetol und Harnstoff reagiert, wird ebenfalls verringert.

Zur Erzielung desselben Effektes ( $E_{264}$ ) der Spaltung von TT in T ist im Vergleich zur cysteinfreien Lösung in Gegenwart von 100  $\mu g/ml$  Cystein eine um 31 krad höhere Dosis und in Gegenwart von 200  $\mu g/ml$  Cystein eine um 69 krad höhere Dosis erforderlich.

In Abbildung 20 kommt die Schutzwirkung des Cysteins deutlich durch den flacheren Kurvenverlauf bei 100 und 200  $\mu g/ml$  Cysteinzusatz zur TT-Lösung zum Ausdruck. Cystein übt vermutlich einen Konkurrenzschutz (14) aus. Es reagiert einmal mit dem Sauerstoff und verhindert damit zum Teil die Bildung von OH-Radikalen. Zum andern reagiert es mit den gebildeten Radikalen in Konkurrenz zum Thymin.

Von der Schutzwirkung der Proteine hängt es wahrscheinlich ab, daß intrazellulär direkter und indirekter Strahleneffekt auf empfindliche Biomoleküle etwa gleich groß sind, abhängig von der getesteten Zellfunktion.

In wässriger Lösung liegt das Verhältnis von direkter zu indirekter Strahlenwirkung weit auf der Seite der indirekten Strahlenwirkung. So werden z.B. bei der Bestrah-

lung von 5 mg/ml Ribonuclease in wässriger Lösung durch  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung 99 % der RN-ase-Moleküle durch Wasser-radikale zerstört (14).

#### 5.6 Die Spaltung von TT in monomeres und die relative biologische Wirksamkeit von Röntgenstrahlen und schnellen Elektronen

Ausgangspunkt für die durchgeführten Untersuchungen war die Frage, wie sich das dimere Thymin gegenüber unterschiedlich energiereicher Strahlung verhält.

Die verwendete Strahlenenergie schwankt dabei zwischen 25 kV und 34 MeV.

Aus Bestrahlungsversuchen an biologischen Objekten ist bekannt, daß schnelle Elektronen gegenüber Röntgenstrahlen eine geringere biologische Wirksamkeit haben. Sie beträgt ca. 0,8 gegenüber 1 der Röntgenstrahlen.

Durch UV-Bestrahlung kann Thymin in der Zelle dimerisieren. In den Hautzellen geschieht dies z.B. durch Sonneneinstrahlung. Durch Enzyme werden normalerweise die Dimeren eliminiert.

Ist die reaktivierende Enzymfunktion gestört, so kommt es zur Hauterkrankung, der sogenannten Xeroderma pigmentosum. In der gesunden Zelle findet sich normalerweise kein TT.

Hier soll die Wirkung der ionisierenden Strahlen auf TT mit der RBW dieser Strahlen verglichen werden, da TT infolge seiner leichten Spaltbarkeit eventuell als Testsubstanz für Bestrahlungsversuche an biologischen Objekten in Frage kommt.

Beim Vergleich muß berücksichtigt werden, daß sich die RBW aus verschiedenen Zellschädigungen zusammensetzt. So gibt es Strahlenschäden am Zellkern, an der Membran, im

Zytoplasma, im Repair-System u.a.(52).

Bei der Strahlenwirkung auf TT sind nur zwei Prozesse zu betrachten, die Spaltung des dimeren und die Zerstörung des monomeren. -

Die unterschiedliche RBW verschiedener Strahlenqualitäten wird heute meistens in einer unterschiedlichen primären Wirkung gesucht sowie in einer erhöhten Peroxydbildung durch eine Konzentrierung der Wasserradikale bei Strahlen mit hohem LET.

Ein weiterer Ansatzpunkt wird in der Untersuchung der Strahlenwirkung auf die "Erholungssysteme", welche sekundär den Strahleneffekt in großem Maße beeinflussen, gesehen (49).

RBW wie auch TT-Spaltung sind abhängig von der Umgebung des Reaktionssystems, von der Dosishöhe sowie der zeitlichen Verteilung der Dosis (49). Dabei fällt auf, daß bei Vergleichen der RBW keine Dosisleistung angegeben ist. Dies erscheint aber notwendig, da im Fall einer extrem geringen Dosisleistung keine biologische Wirksamkeit zu erwarten ist.

Die Dosisleistung spielt bei der TT-Spaltung eine wichtige Rolle, wie aus Abbildung 19 hervorgeht.

Abbildung 21 zeigt, daß die Elektronen eine größere Wirkung auf die Spaltung des TT ausüben als die Röntgenstrahlen. Anders sieht es in Abbildung 22 aus, die die TT-Spaltung bei gleicher Dosisleistung von Elektronen und 130 kV-Röntgenstrahlen zeigt.

Im Maximum der Elektronenkurve liegt die Wirkung der Elektronenstrahlen in Bezug auf die T-Erzeugung um den Faktor 0,87 unter der Wirkung der 130 kV-Röntgenstrahlen. Vergleicht man die Maxima beider Kurven unabhängig von der Dosis miteinander, so ergibt sich für die Elektronen eine um den Faktor 0,75 geringere Wirkung.

Diese Werte liegen im Bereich des Faktors 0,8 der RBW

für schnelle Elektronen.

Allerdings ist bei dieser Betrachtung nur die Entstehung der Extinktion, die auf einer Bildung von T beruht, berücksichtigt worden. Tatsächlich handelt es sich am Extinktionsmaximum um ein Gleichgewicht zwischen Monomerisation von TT und Zerstörung des Pyrimidinringes.

## 6 Zusammenfassung der eigenen Ergebnisse

Dimeres Thymin (TT) wird in kristalliner Form durch UV-Bestrahlung von gefrorener wässriger Lösung von monomeren Thymin (T) hergestellt.

An Hand hergestellter Lösungsgemische von T und TT werden bei bekannten Gesamtkonzentrationen die Anteile beider Komponenten spektralphotometrisch bestimmt.

Durch Applikation ionisierender Strahlung auf wässrige, luftgesättigte Lösungen von TT kann die strahleninduzierte Bildung von T mittels obiger Eichkurven spektralphotometrisch verfolgt werden.

Folgende Ergebnisse werden erhalten:

1. Die Menge an strahleninduziertem T ist bei gleicher absorbiertener Röntgenstrahlen-Dosis um so größer, je höher die Anfangskonzentration an TT ist (s. Abb. 16, S. 42)
2. Die maximale strahleninduzierte Menge an T steigt mit zunehmender Ausgangskonzentration von TT an und verschiebt sich gleichzeitig in Richtung größerer Röntgenstrahldosen (s. Abb. 17, S. 43).
3. Die Menge des gebildeten T aus TT steigt bei gleicher applizierter Röntgendosis mit der Temperatur an (s. Abb. 18, S. 45). Mit fallender Temperatur verringert sich die maximal gebildete Menge an T und das Extinktionsmaximum verschiebt sich nach höheren Strahldosen hin.
4. Die durch 130 kV-Röntgenbestrahlung aus TT gebildete maximale Menge an T ist von der Dosisleistung abhängig (s. Abb. 19, S. 46) und nimmt mit geringerer Dosisleistung zu.
5. Der Zusatz von Cystein bewirkt sowohl bei der Spaltung von TT in T als auch bei der Zerstörung des monomeren Pyrimidins (Extinktionsabnahme) einen Schutzeffekt. (s. Abb. 20, S. 48)

6. Die Spaltung von TT in T hängt von der Energie der applizierten Elektronen- bzw. Röntgenstrahlung ab (s.Abb.21, S.49).

Bei Bestrahlungsbeginn ist sie um so größer, je höher die Strahlenenergie ist.

Die Signifikanz der Unterschiede zwischen 35, 130 und 250 kV-Röntgenstrahlen bei der T-Erzeugung wurde statistisch nachgewiesen.

Die maximale T-Bildung liegt bei gleicher Dosisleistung für 130 kV-Röntgenstrahlen um ca. 33 % höher als für 34 MeV-Elektronen (s.Abb.22, S.52).

Wirkungsmechanismen und Analogien zur relativen biologischen Wirksamkeit werden diskutiert.

7        Literaturverzeichnis

- 1    Watson, J.D.; F.H.Crick  
Nature 171, 737 (1953)  
Nature 171, 964 (1953)  
Cold spring Harbor.Symp. Quant. Biol. 18, 123 (1953)
- 2    Karlson, P.  
Lehrbuch der Biochemie  
Verlag Georg Thieme, Stuttgart (1967)
- 3    Beukers, R.; J.Ylstra; W.Berends  
The effect of ultraviolet light on some components  
of the nucleic acids  
Rec. trav. chim. 77, 729 (1958)
- 4    Beukers, R.; W.Berends  
Isolation and identification of the irradiation  
product of thymine  
Biochim. Biophys. Acta 41, 550 (1960)
- 5    Wang, S.Y.  
Photochemical Reaktionen in Frozen Solutions  
Nature 190, (1961) 690  
Nature 188, 844 (1961)
- 6    Wacker, A.; H.Dellweg; L.Träger; A.Kornhauser;  
E.Lodemann; G.Türck; R.Selzer; P.Chandra; M.Ishimoto  
Organic Photochem. of Nucleic Acids  
Photochem. et Photobiol. 3, 369 (1964)
- 7    Wacker, A.; H.Dellweg; D.Weinblum  
Strahlenchemische Veränderung der Bakterien-DNA in vivo  
Naturwiss. 477 (1960)
- 8    Weinblum, D.; H.E.Johns  
Isolation and properties of isomeric Thymine dimers  
Biochim. Biophys. Acta 114, 450 (1966)
- 9    Blackburn, G.M.; R.J.H.Davies  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 22, 704 (1966)

- 10 Weinblum, D.;  
Characterization of the Photodimers from DNA  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 27, 384 (1967)
- 11 Blackburn, G.M.; R.J.H. Davies  
The Structure of Thymine Photo-dimer  
J. Chem. Soc. 2239, (1966)
- 12 Wulff, D.L.; G. Fraenkel  
On the nature of thymine Photoproduct  
Biochim. Biophys. Acta 51, 332 (1961)
- 13 Platzmann, R.L.  
Vortex 23, 372 (1962)
- 14 Dertinger, H.; H. Jung  
Molekulare Strahlenbiologie  
Springer-Verlag, Berlin (1969)
- 15 Baudisch, O.; W.L. Bass  
J. Am. Chem. Soc. 46, 184 (1924)
- 16 Baudisch, O.; D. Davidson  
J. Biol. Chem. 64, 233 (1925)
- 17 Wacker, A.; A. Gerstenberger  
Photoreaktivierung mit Wasserstoffperoxyd  
Angew. Chemie 75, 916 (1963)
- 18 Varghese, A.J. und C.S. Rupert  
UV-irradiation of cytosine nucleotides in frozen  
solutions produces cyclobutane-type dimeric products  
Photochem. Photobiol. 13, 365 (1971)
- 19  
Ergebnisse der medizinischen Strahlenforschung  
Verlag Georg Thieme, Stuttgart (1964)
- 20 Bunke, W.  
Synergistische und antagonistische Effekte von UV-  
und Röntgen-Strahlen auf unterschiedlich strahlen-  
empfindliche Keime von E.coli B  
Dissertation FU (1969)

- 21 Wacker, A.; H. Dellweg; E. Lodemann  
Strahlenchemische Veränderung der Nucleinsäuren  
Angew. Chem. 73, 64 (1961)
- 22 Wacker, A.; L. Träger; D. Weinblum  
Strahlenchemische Veränderung von Pyrimidin-ribosiden  
und Pyrimidinen  
Angew. Chem. 73, 65 (1961)
- 23 Dellweg, H.; A. Wacker  
Strahlenchemische Veränderungen von Thymin und Cytosin  
in der DNS durch UV-Licht  
Z. Naturforschg. 17b, 827 (1962)
- 24 Weinblum, D.  
Strahlenchemische Reaktionen von Nucleinsäuren und  
Nucleinsäurekomponenten  
Dissertation an der Techn. Universität Berlin (1961)
- 25 Lochmann, E. R.  
Wirkung von UV- und Röntgenstrahlen auf Nucleinsäure  
Stoffwechsel von Pterinen bei Mikroorganismen  
Dissertation an der Techn. Universität Berlin (1961)
- 26 Johns, H. E.; S. A. Rapaport; M. Delbrück  
Photochemistry of Thymine Dimers  
J. Mol. Biol. 4, 104 (1962)
- 27 Moore, A. M.  
Ultraviolet Irradiation of Pyrimidine Derivatives.  
II. Note on the Synthesis of the Product of ~~R~~<sup>S</sup>versible  
Photolysis of Uracil.  
Can. J. Chem. 36, 281 (1958)
- 28 Sinsheimer, R. L.; R. Hastings  
Science 110, 525 (1949)
- 29 Danilov, V. J.  
On the Mechanism of Photodimerization of Pyrimidine Bases  
Photochem. Photobiol. 6, 233 (1967)

- 30 Bollum, F.J.; R.B. Setlow  
Ultraviolet inactivation of DNA primer activity  
1. Effects of different wavelength and doses  
Biochim. Biophys. Acta 68, 599 (1963)
- 31 Setlow, R.B.  
Biochim. Biophys. Acta 49, 237 (1961)
- 32 Lochmann, E.R.; G. Riebke  
Die Umwandlung von Thymin-2-<sup>14</sup>C durch Röntgenstrahlen  
in vitro und in vivo  
Naturwiss. 49, 158 (1962)
- 33 Lochmann, E.R.  
Spaltung von Thymindimer in monomeres Thymin durch  
Röntgenstrahlen  
Naturwiss. 50, 474 (1963)
- 34 Schmidt, B.; D. Hartmann; K. Großgebauer; W. Schumacher  
Die Aufspaltung von dimerem Thymin in monomeres  
durch ionisierende Strahlung  
Naturwiss. 50, 473 (1963)
- 35 Schmidt, B.; D. Hartmann; K. Großgebauer; W. Schumacher  
Splitting of Uracil Dimer by High energy Electrons  
Nature 199, 504 (1963)
- 36 Greulich, V.; D. Hartmann; B. Schmidt  
Spaltung von dimerem Thymin in E.coli durch schnelle  
Elektronen  
Z. Naturforschg. 23b, 755 (1968)
- 37 Greulich, V.  
Nachweis der Spaltung von Dimerem Thymin in der DNS  
von E.coli BS-1 durch schnelle Elektronen  
Dissertation an der Freien Universität Berlin (1970)
- 38 Deering, R.A.; W. Snipes  
 $\gamma$ -Irradiation of Thymine Dimers in Aqueous Solution  
Biophys. J. 8, 326 (1968)

- 39 Snipes, W.; R.A. Deering  
Highly Efficient Monomerization of Thymine Dimers  
by Gamma Irradiation in the Solid State  
J. Chem. Phys. 51, 1268 (1969)
- 40 Weinblum, D.  
Radiolysis of the Dimers of Dimethylthymine in the  
Crystalline State  
Rad. Res. 39, 731 (1969)
- 41 Hartmann, D.  
Die Spaltung von dimerem Thymin durch ionisierende  
Strahlung und ihre Auswirkung bei der Inaktivierung  
von Bakterien  
Habilitationsschrift, Freie Universität Berlin (1970)
- 42 Fritz-Niggli, H.  
Strahlenbiologie, Grundlagen und Ergebnisse  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1959)
- 43 Wacker, A; E.R. Lochmann  
Zur strahlenchemischen Dimerisierung des Thymins  
Z. Naturforsch. 17b, 351 (1962)
- 44 Szybalski, W.;  
Molecular Events Resulting in Radiation Injury,  
Repair and Sensitization of DNA  
Rad. Res. Suppl. 7, 147 (1967)
- 45 Law, J.  
Plastic Irradiation Vessels for Ferrous Sulphate Dosimetry  
Phys. Med. Biol. 15, 117 (1970)
- 46 Bewley, D.K.  
Measurement of the Polarization Correction  
Using the Fricke Dosimeter  
Symposium on High-Energy Elektrons, Montreux 1964  
Springer-Verlag, Berlin (1965)

4. [redacted],  
Statistische Auswertungsmethoden, 2. Auflage  
Sprinter-Verlag, Berlin (1969)
- Geigy, J.R.  
Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabelle, 6. Auflage
- [redacted],  
Die Bedeutung des Repairs, Stems für die relative  
biologische Wirksamkeit von Strahlen verschiedener  
Qualität; eine Zwei-Stem-Theorie  
Strahlentherapie 145/2, 202 (1968)
50. [redacted],  
[redacted] - [redacted]  
Springer-Verlag, Berlin (1969)
- Beta, P.  
Electron Spin Resonance Study of Radicals Produced  
in Irradiated Aqueous Solutions of Uracil and  
Related Pyrimidines  
Rad. Res. 49, 1 (1972)
2. [redacted]; [redacted]  
Verschiedene Mechanismen der Strahlen-Inaktivierung  
in Abhängigkeit von der Dosis und physiologischen  
Parametern  
Biophysik 6, 46 (1969)
53. Patt, H.M.; E.B. Tyree; R.L. Straube; D.E. Smith  
Cysteine protection against x-irradiation  
Science 110, 213 (1949)
54. [redacted],  
A method of oxygen assay applied to a study of the  
removal of dissolved oxygen by cysteine and cysteamine  
Progress in Radiology by J.S. Mitchell, B.E. Holms, C.L. Smith  
Oliver & Boyd, Edinburgh (1956)



Herrn Professor Dr. Dieter Hartmann danke ich ganz besonders für die Hilfe bei der Einarbeitung in die Problematik und für die ständige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dipl.- math. Thomas vom Institut für medizinische Statistik danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Meßergebnisse.

Ebenfalls danke ich Frau Tabeau vom Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie für die Hilfe bei der Aufnahme und Entwicklung der Fotografien.

Besonderer Dank gebührt auch meinen Eltern für die ständige Unterstützung während meiner Ausbildung.



## LEBENS LAUF

Wolf-Diederich Lienau

- 19.10.1944 geboren in Lübeck als Sohn des Diplom-Landwirtes Dr. Wolfgang Lienau und seiner Ehefrau Elfriede, geb. Jacobi
- 1951 - 1955 Besuch der Grundschule in Lübeck
- 1955 - 1964 Katharineum zu Lübeck  
mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig
7. 2.1964 Reifeprüfung
- 1964 - 1966 Wehrdienst bei den Leichten Pionieren
- 1966 - 1972 Studium der Zahnmedizin an der Freien Universität Berlin
18. 8.1967 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
31. 3.1969 Zahnärztliche Vorprüfung
27. 1.1972 Abschluß des Zahnärztlichen Staatsexamens
- Seit 1.7.72 Wissenschaftlicher Assistent an der Poliklinik und Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten der Freien Universität Berlin





